

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:
Biologie
Studijní obor:
Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Michaela Schneiderová

**Heterologní exprese genu pro esterasu alfa-aminokyselin z kmene
Achromobacter sp. CCM 4824 v *Escherichia coli* BL21(DE3)**

A heterologous expression of alpha-amino acid ester hydrolase from the strain
Achromobacter sp. CCM 4824 in *Escherichia coli* BL21(DE3)

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce / Školitel:

RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Odborný konzultant:

RNDr. Václav Štěpánek, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 08. 2015

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem pracovníkům Laboratoře enzymových technologií MBÚ AV ČR v.v.i., nejen za jejichž pomoc a cenné rady, které mi pomohly překonat mnoho překážek, ale také za přátelský a milý kolektiv, kterého jsem mohla být součástí. Jmenovitě bych chtěla moc poděkovat RNDr. Pavlovi Kyslíkovi, CSc. a RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. a Mgr. Jiřímu Zahradníkovi.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mi pomáhali a podporovali mne ve studiu.

Abstrakt

Na chromosomální DNA mikroorganismu *Achromobacter* sp. CCM 4824, který byl získaný v Laboratoři enzymových technologií, MBÚ AVČR, v.v.i., byl identifikován gen pro enzym hydrolyzující semi-syntetická β -laktamová antibiotika ampicilin a cephalexin s postranním řetězcem D-fenylglycinem. Enzym je zařazen mezi esterasy α -aminokyselin, které jsou zajímavé pro své potenciální využití při kineticky řízené syntéze těchto antibiotik. V několika aspektech mohou být esterasy α -aminokyselin lepší, než současně používané penicilinacylasy, a proto jsou tyto enzymy předmětem širokého zájmu. Chromosomálně nesený gen kódující esterasu α -aminokyselin byl klonován, charakterizován a heterologně exprimován ve zkonstruovaném, vysoce produkčním bakteriálním systému *Escherichia coli* BL21(DE3)JM5. Produkovaný enzym byl purifikován a byly stanoveny jeho vlastnosti, důležité z hlediska možného použití při výrobě semi-syntetických β -laktamových antibiotik.

Klíčová slova: esterasa alfa-aminokyselin, *Achromobacter* sp., rekombinantní expresní systém, β -laktamová antibiotika

Abstract

On the chromosomal DNA of the microorganism *Achromobacter* sp. CCM 4824, which was gained in the Laboratory of enzyme technology MBU AVCR v.v.i., there was identified a gene coding an enzyme capable of hydrolyzation of semi-synthetic β -lactam antibiotics ampicillin and cephalosporin with a D-phenylglycine as a side chain. This enzyme belongs to a group of α -amino acid esterases, which are interesting because of a potential use in kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics. In several aspects α -amino acid esterases might be better than actually used penicillin acylases and that is why these enzymes are subjects of a big interest. The gene for α -amino acid esterase coded by chromosomal DNA was cloned, characterized and heterologously expressed in constructed highly-producing bacterial system *Escherichia coli* BL21(DE3)JM5. Produced enzyme was purified and its properties important for possible use in the production of semi-synthetic β -lactam antibiotics were determined.

Key words: alpha-amino acid ester hydrolase, *Achromobacter* sp., recombinant expression system, β -lactam antibiotics

Obsah

Seznam zkratk	9
1. Úvod	10
2. Literární úvod	11
2.1 β -laktamová antibiotika	12
2.2 Průmyslová výroba β -laktamových antibiotik	13
2.3 Penicilinacylasy	13
2.3.1 Penicilin-G-acylasy	15
2.3.2 Penicilin-V-acylasy	15
2.4 Esterasy α -aminokyselin	15
2.4.1 Valacyklovirasy	16
2.4.2 Esterasy α -aminokyselin	16
2.4.2.1 Gen pro AEH	16
2.4.2.2 Protein	17
2.4.2.2.1 Nativní struktura	18
2.4.2.2.2 Struktura monomeru	19
2.4.2.2.3 Aktivní místo	20
2.4.3 Průmyslové využití AEH	21
2.5 Bakteriální expresní systémy	22
2.5.1 Expresní systém v <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	23
2.5.2 Expresní systémy pro AEH	24
3. Cíle práce	26
4. Materiál	27
4.1 Plasmidy a DNA	27
4.2 Primery	29
4.3 Markery	30
4.4 Mikroorganismy	30
4.5 Kultivační media	30
4.6 Použité enzymy	30
4.7 Pufry a roztoky	30
4.8 Chemikálie	31

5. Metody	33
5.1 Izolace plasmidové DNA	33
5.2 PCR	33
5.2.1 Návrh primerů	33
5.2.2 PCR amplifikace strukturního genu	34
5.2.3 Adenylace 3' konců PCR amplikonů	34
5.2.4 Colony PCR	35
5.3 Sekvence DNA	35
5.4 Elektroforetická analýza	35
5.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza	35
5.4.1.1 Izolace z gelu	36
5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza	36
5.4.2.1 Příprava vzorků pro SDS – PAGE	37
5.5 Restrikce	37
5.6 Ligace	37
5.7 Transformace kompetentních buněk	38
5.7.1 Příprava chemicky kompetentních buněk	38
5.8 Maloobjemové kultivace	39
5.8.1 Příprava glycerinové konzervy	39
5.9 Kultivace v laboratorním míchaném bioreaktoru	39
5.9.1 Příprava inokula	39
5.9.2 Kultivace v míchaném bioreaktoru	40
5.9.3 Příprava vzorků pro stanovení hydrolytické aktivity proteinu	40
5.9.4 Příprava vzorků pro suché hmotnosti buněk a její stanovení	41
5.9.5 Stanovení koncentrace zbytkové laktosy v mediu	41
5.10 Izolace nativního enzymu	42
5.10.1 Sonikace	42
5.10.2 Frakční srážení síranem amonným	42
5.10.3 Dialýza	43
5.10.3.1 Příprava dialyzačních střívek	43
5.11 Purifikace enzymu	43

5.11.1 Chromatografie na koloně s náplní fractogel COO ⁻	43
5.11.2 Gelová filtrace	44
5.12 Stanovení koncentrace proteinů	44
5.13 Stanovení specifické hydrolytické aktivity AEH na ampicilin	44
5.13.1 Výpočet hydrolytické aktivity AEH pro hydrolýzu ampicilinu	45
5.14 Substrátová specifita hydrolytické reakce AMP	46
5.15 Teplotní stabilita a teplotní optimum AEH pro hydrolýzu ampicilinu	46
5.16 pH optimum AEH	46
6. Výsledky	48
6.1 Primery pro amplifikaci <i>aeH_{Asp}</i> PCR reakcí	48
6.2 Optimalizace PCR reakce	49
6.3 Subklonování strukturního genu <i>aeH_{Asp}</i>	51
6.4 Analýza sekvence <i>aeH_{Asp}</i> a peptidu AEH _{Asp}	52
6.5 Příprava expresního systému pro AEH _{Asp} v <i>E. coli</i> BL21(DE3)	55
6.6 Kultivace <i>E. coli</i> BL21(DE3)JM5 v míchaném bioreaktoru	57
6.7 Izolace a purifikace AEH	58
6.8 Stanovení některých vlastností purifikovaného enzymu	62
7. Diskuze	65
8. Souhrn	69
9. Seznam citací	70

Seznam zkratek:

6-APA	Kyselina 6-aminopenicilanová
7-ACA	Kyselina 7-aminocefalosporanová
7-ADCA	Kyselina 7-aminodeacetoxycefalosporanová
α – C	Molekula uhlíku na pozici α
AEH	Esterasa α -aminokyselin
AEH _{Act}	AEH z organismu <i>Acetobacter turbidans</i>
AEH _{Xc}	AEH z organismu <i>Xanthomonas citri</i>
AEH _{Xr}	AEH z organismu <i>Xanthomonas rubrilineans</i>
AEH _{Asp}	AEH z organismu <i>Achromobacter</i> sp. CCM 4824
ApA	Ampicilinacylasa
Asp	Asparagin
bp	Páry bází
D-HPG	D-hydroxyfenylglycin
D-PG	D-fenylglycin
Fwd	Forward
<i>gaa</i>	Gen pro enzym glutaryl-7-ADCA-acylasa
GAA	Glutaryl-7-ADCA-acylasa
His	Histidin
NI	Normalizované litry
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
NPGB	4-nitrofenyl-G-guanidinbenzoát
nt	Nukleotid
<i>Ori</i>	Začátek replikace (<i>Origin</i>)
p-NPGB	para-4-nitrofenyl-G-guanidinbenzoát
PA	Penicilinacylasa
PGA	Penicilin-G-acylasa
PVA	Penicilin-V-acylasa
Rev	Reverse
Ser	Serin
TBE	Tris borátový pufr

1. Úvod

β -laktamová antibiotika jsou široce používané antimikrobiální látky, mezi něž patří hlavně peniciliny a cefalosporiny. Několik základních typů těchto antibiotik je získáváno izolací z původních produkčních organismů, ale většina používaných léků je již tvořena semi-syntetickými β -laktamovými antibiotiky, které mají stejnou základní strukturu charakteristickou pro β -laktamy, ale jejich postranní řetězec je modifikovaný. Průmyslová produkce β -laktamů probíhá formou chemické syntézy nebo biotransformace, při níž jsou používány zejména penicilinacylasy, katalyzující hydrolýzu přírodních β -laktamů za vzniku jádra penicilinů nebo cefalosporinů, které může být následně použito jak základní stavební kámen při výrobě semi-syntetických β -laktamových antibiotik.

Esterasy α -aminokyselin jsou enzymy, které se svou aktivitou podobají penicilinacylasam, ale zároveň mají vlastnosti, jež je mohou činit vhodnější pro použití v průmyslu. Esterasy α -aminokyselin byly popsány a izolovány z několika bakteriálních kmenů a v některých případech byl vytvořen také expresní systém pro daný enzym.

V této práci byl amplifikován gen pro esterasy α -aminokyselin, jež byl identifikován v chromosomální DNA *Achromobacter* sp. CCM 4824. Se získaným genem byl vytvořen expresní systém v *Escherichia coli* BL21(DE3). Pro tento expresní systém byly ověřeny podmínky velkoobjemové kultivace v míchaném bioreaktoru a následně byl rekombinantní protein izolován a purifikován. Také byly stanoveny základní vlastnosti purifikovaného enzymu.

2. Literární úvod

1.1 β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika patří mezi základní antimikrobiální sloučeniny, které jsou využívány v medicíně už více než 50 let. Jsou to baktericidní látky, blokující syntézu buněčné stěny gram-pozitivních bakterií. Přirozené β -laktamy jsou získávány fermentacemi produkčních organismů, jako např. *Penicillium chrysogenum* (Elander 2003), ale v klinické praxi mají významné využití také β -laktamy syntetické a semi-syntetické. Široké použití těchto farmak umožňuje jejich poměrně dobrý průnik do biologických tekutin a výborný bezpečnostní profil, tj. jsou velmi málo toxické a nemají téměř žádné vedlejší účinky, pokud není pacient na β -laktamy přecitlivělý. Antibiotika izolovaná z přírodních zdrojů však mají obvykle úzké spektrum účinku, často například působí jen na gram-pozitivní bakterie, především na streptokoky a stafylokoky, které neprodukují β -laktamasy (Lincová et al. 2007).

Základní strukturu β -laktamových antibiotik tvoří čtyřčlenný β -laktamový kruh, který může a nemusí být vázaný na další heterocyklus, podle nějž je dělíme na: peniciliny, které mají β -laktamový kruh spojený s thiazolidinovým pětičlenným heterocyklem, cefalosporiny, které jsou tvořeny β -laktamovým kruhem s šestičlenným dihydrothiazinovým heterocyklem, monocyklické monobaktamy, atd. Různé druhy přírodních antibiotik mají na základní strukturu jádra β -laktamových antibiotik připojené různé postranní řetězce.

Semi-syntetická β -laktamová antibiotika jsou uměle vytvořené baktericidní látky, jejichž struktura vychází z přírodních penicilinů a cefalosporinů. Modifikovaná struktura vzniká tak, že na jádro β -laktamových antibiotik (kyselina 6-aminopenicilanová, 6-APA, kyselina 7-aminocefalosporanová, 7-ACA nebo kyselina 7-aminodeacetoxycefalosporanová, 7-ADCA) připojíme vybraný postranní řetězec (Rolinson et al. 1960). Takto vzniklá antibiotika získají širší spektrum účinku, přičemž je zachováno malé množství vedlejších účinků na člověka (Andersson et al. 2001).

Širokospektré peniciliny dělíme obecně do 3 skupin: aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin), karboxypeniciliny (ticarcilin) a acylureidopeniciliny (piperacilin), přičemž jejich spektrum účinku je rozšířeno o některé gram-negativní bakterie a zároveň jsou účinnější proti enterokokům. Žádné z těchto antibiotik však není odolné proti β -laktamasam.

Cefalosporiny jsou rozdělené do 4 generací podle uvedení do klinické praxe a zároveň podle jejich vlastností. Cefalosporiny mají oproti penicilinům širší spektrum účinku, s vyšší

generací antibiotika se zlepšuje efekt proti gram-negativním mikrobům a zároveň snižuje účinek na gram-pozitivní bakterie. Mezi široce používané cefalosporiny patří například: cefazolin, cefalexin (1. generace), cefuroxim (2. generace), ceftazidim, cefoperazon, cefotaxim, cefixim (3. generace), cefpirom a cefepim (4. generace).

β -laktamová antibiotika mají obecně nízkou odolnost proti β -laktamasám, bakteriálním enzymům, které štěpí β -laktamový kruh antibiotik a tím ruší jejich antibakteriální účinek. Produkce β -laktamas je hlavním a nejvýznamnějším druhem rezistence na peniciliny a cefalosporiny. Tato situace je ve farmaceutické praxi řešena přidáváním inhibitorů β -laktamas do léčiv – mezi nejčastěji používané inhibitory patří kyselina klavulanová, sulbactam a tazobactam (Lincová et al. 2007). Přes rozšiřující se rezistenci si udržují β -laktamy stále velmi dobrou účinnost na citlivé kmeny, takže semi-syntetická β -laktamová antibiotika tvoří až 55% celosvětového trhu s antibiotiky a jejich spotřeba stále významně narůstá (Van Boeckel et al. 2014).

1.2 Průmyslová výroba β -laktamových antibiotik

Masové užívání semi-syntetických β -laktamových antibiotik je podmíněné efektivní průmyslovou výrobou. Ta může probíhat formou chemické syntézy, nebo biotransformace, přičemž v současnosti jsou využívány obě možnosti produkce. Biotransformační výrobu semi-syntetických β -laktamových antibiotik lze rozdělit do dvou hlavních kroků: 1. hydrolýza β -laktamových antibiotik za vzniku jádra β -laktamů (6-APA, 7-ACA, 7-ADCA), 2. jeho kondenzace s acyldonorem za vzniku daného antibiotika (Shewale a Sivaraman 1989).

Biotransformace využívá různé enzymy, nejčastěji však penicilinacylasy, které jsou schopné katalyzovat oba kroky výroby, ačkoliv stejným způsobem fungují také esterasy α -aminokyselin (Takahashi et al. 1972). V praxi však nacházejí uplatnění i enzymy, které se účastní pouze přípravy β -laktamového jádra, např. cefalosporinacylasy (Sudhakaran et al. 1992), oxidasy-D-aminokyselin (Konno a Yasumura 1992).

Biotransformace má oproti chemické produkci antibiotik několik významných výhod, a to jak ekologických, tak i ekonomických. Enzymy např. umožňují zjednodušení procesu výroby snížením počtu především purifikačních kroků, produkují výrazně méně nebezpečného odpadu (Ospina et al. 1996), atd.

1.3 Penicilinacylasy (PA; EC 3.5.1.11)

Penicilinacylasy jsou enzymy, které selektivně hydrolyzují amidovou vazbu mezi β -laktamovým jádrem a postranním řetězcem, aniž by porušily amidovou vazbu uvnitř β -laktamového kruhu a pravděpodobně se účastní katabolismu fenylacetylových molekul (Giordano et al. 2006). Dělíme je podle substrátové specifity na penicilin-G-acylasy (PGA), penicilin-V-acylasy (PVA) (Sudhakaran et al. 1992) a ampicilinacylasy (ApA) (Kim a Byun 1990). Průmyslově nejpoužívanější penicilin-G-acylasy byly izolovány z mnoha druhů bakterií a to jak gram-negativních např. *Escherichia coli* (Cole 1969b), *Providencia rettgeri* (Klei et al. 1995), *Achromobacter* sp. (Plháčková et al. 2003), tak i gram-pozitivních např. *Bacillus megaterium* (Chiang a Bennett 1967), *Arthrobacter viscosus* (Ohashi et al. 1988), *Bacillus badius* (Rajendhran a Gunasekaran 2007).

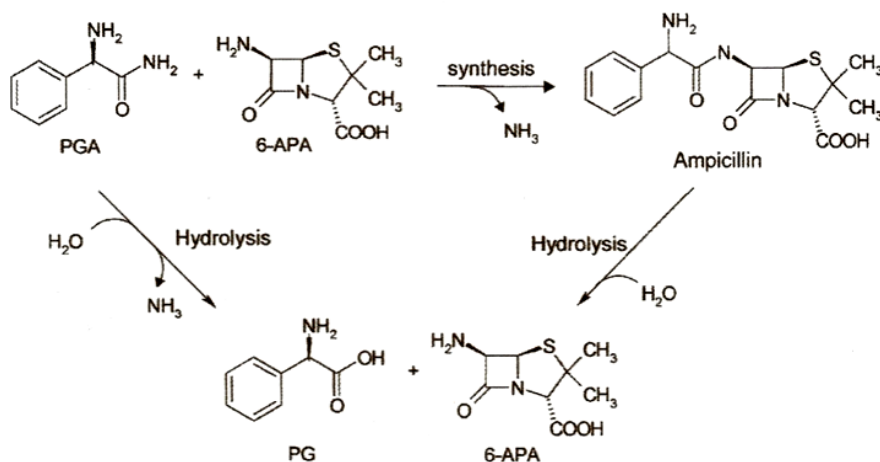
Jak už bylo zmíněno, penicilinacylasy katalyzují také kondenzaci β -laktamového jádra s acyldonorem, ale do reakce musí být použit jeho ester nebo amid (Bruggink et al. 1998). Tyto vlastnosti penicilinacylas by umožňovaly tzv. „one-pot“ výrobu β -laktamů, kde by probíhala hydrolýza přírodního antibiotika a zároveň by vznikající jádro kondenzovalo s acyldonorem za vzniku semi-syntetického β -laktamového antibiotika. Tato reakce ještě není optimalizovaná natolik, aby byla použita v průmyslovém měřítku, takže v praxi jsou zatím zavedeny výroby β -laktamových jader a semi-syntetických β -laktamových antibiotik odděleně.

1.3.1 Penicilin-G-acylasa

PGA izolovaná z *E. coli* je řazena mezi N-terminální nukleofilní hydrolasy. Strukturu enzymu tvoří malá (α) a velká (β) podjednotka o velikostech 209 a 553 aminokyselin, gen pro PGA má 2 535 nukleotidů, včetně signální sekvence a „spaceru“ mezi podjednotkami (Robas a Branlant 1994). K produkci PGA se používá přítokovaná (fed-batch) kultivace rekombinantního systému *E. coli* za podmínek specifických pro nejvyšší možnou produkci PGA (Bhattacharya et al. 1993).

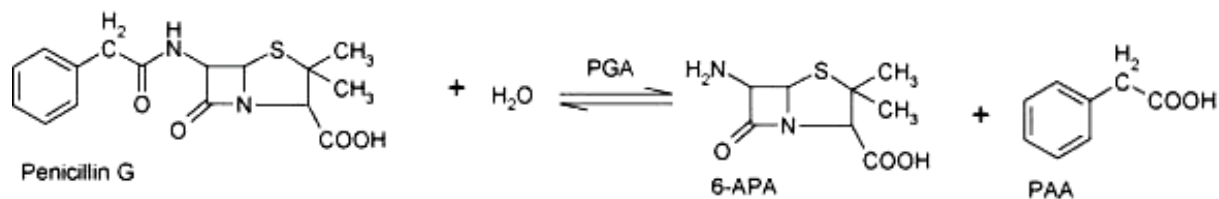
Užití PGA při výrobě semisyntetických antibiotik má stále několik nevýhod, které se vědci snaží zcela odstranit, či alespoň minimalizovat. Při syntetické reakci totiž dochází také k hydrolýze acyldonoru, a jelikož hydrolyzovaný substrát už nevstupuje do syntetické reakce, tím ubývají reaktanty bez syntézy produktů (Obr. 1). Tento jev popisuje tzv. S/H poměr (poměr syntézy oproti hydrolýze), čím je vyšší, tím lepší je daný enzym pro výrobu antibiotik. PGA jsou

cíleně mutovány a modifikovány pro zlepšení S/H poměru, ale i jiných jejich vlastností tak, aby ještě více vyhovovaly požadavkům pro průmyslové využití (Alkema et al. 2000; Jager et al. 2008; Arshad et al. 2010a; Arshad et al. 2010b; Deaguero et al. 2012).



Obr. 1: Schéma syntetické i vedlejších hydrolytických reakcí β -laktamů katalyzovaných PGA (Jager et al. 2007).

Další velkou nevýhodou je inhibice PGA kyselinou fenylactovou, která vzniká jako vedlejší produkt při syntéze semi-syntetických antibiotik (Obr. 2) (Balasingham et al. 1972).



Obr. 2: Hydrolýza penicilinu G katalyzovaná PGA (Chandel et al. 2008).

Nedostatky PGA tak vytvářejí prostor pro hledání jiných využitelných enzymů, které katalyzují syntetickou reakci, jako jsou esterasy α -aminokyselin.

1.3.2 Penicilin-V-acylasy

Přestože se výzkum zaměřuje hlavně na PGA a její aplikaci do praxe, a to hlavně z toho důvodu, že penicilin V je o 10 – 15 % dražší substrát než penicilin G, vykazují PVA i několik vlastností, které je činí potencionálně zajímavými. Penicilin-V-acylasy mají užší specifitu než penicilin-G-acylasy, takže se v praxi používají pouze pro výrobu β -laktamových jader a lepší stabilitu v prostředí, ve kterém tato reakce probíhá. Dále vykazují vyšší toleranci k přítomnosti kyseliny fenyloctové a dobře reagují i v systémech, kde je v reakční směsi větší koncentrace substrátu (Shewale a Sudhakaran 1997).

1.4 Esterasy α -aminokyselin (EC 3.1.1.43)

Esterasy α -aminokyselin jsou enzymy s úzkou substrátovou specifikou. Reagují výhradně s estery či amidy aminokyselin, které mají aminoskupinu na α -C. V této skupině rozlišujeme enzymy dle původu na prokaryotické, což jsou enzymy, které katalyzují přenos acylu z esterů α -aminokyselin na jádra β -laktamových antibiotik (6-APA, 7-ACA, 7-ADCA), popřípadě na vodu. Druhá velká skupina enzymů, která má stejnou strukturu i substrátovou specifitu, jsou enzymy charakteristicky izolované z eukaryot a označované jako valacyklovirasy.

1.4.1 Valacyklovirasy

Valacyklovirasy *in vivo* aktivují klinicky důležité prekurzory aktivních látek s antivirovým a antirakovinotvorným účinkem. Aktivace je zajišťována hydrolýzou esterové vazby, čímž vzniká účinná látka a vedlejší produkt, acylový zbytek s α -aminoskupinou. Tyto enzymy byly izolovány z lidské a krysí tkáně. Valacyklovirasy jsou jedny z mála identifikovaných a popsáných enzymů, které se podílí na hydrolýze prekurzorů aktivních látek. Účinné látky léků jsou často podávány ve formě prekurzorů, protože ty mají obvykle lepší vstřebávání a v těle jsou lépe využitelné než čistá aktivní látka. Hlavní skupinu medikamentů, které jsou do těla dodávány jako prekurzory, tvoří perorálně podávané léky. Hlavním substrátem pro aktivitu valacykloviras je valacyklovir, jehož hydrolýzou vzniká acyklovir, antivirotikum používané hlavně proti viru herpes simplex (Burnette et al. 1995; Kim et al. 2003; Kim et al. 2004; Hodge a Field 2013).

1.4.2 AEH

Prokaryotické AEH byly poprvé popsány v roce 1972 výzkumnou skupinou Takahashi et al. v rámci hledání enzymů využitelných pro biokatalytickou produkci semi-syntetických antibiotik a jeho producent byl následně identifikován jako *Pseudomonas danceae* (Takahashi et al. 1974). AEH byly později izolovány a popsány i u dalších organismů: *Xanthomonas citri* IFO 3835 (Kato et al. 1980a), *Xanthomonas rubrilineans* (Wang et al. 2012; Sklyarenko et al. 2014), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Blum a Bommarius 2010), *Acetobacter turbidans* ATCC 9325 (Takahashi, T. et al. 1972), *Pseudomonas melanogenum* IFO 12020 (D. Kim a Byun 1990).

1.4.2.1 Gen pro AEH

Nejlépe byl charakterizován gen izolovaný z *Acetobacter turbidans*. *Aeh_{Act}* má 2 004 nukleotidů a kóduje prekursor pro AEH. Skládá se z N-terminální signální sekvence a genu pro jedinou podjednotku enzymu. Klonování bez signální sekvence vedlo k vzniku neaktivní formy genu, z čehož vyplývá, že signální sekvence má pravděpodobně vliv i na zaujetí správné struktury proteinu. Signální sekvence směřuje protein do periplasmy, kde se neuvolňuje, ale zůstává vázán na membránu. Zároveň s přechodem do periplasmy dochází k odštěpení signální sekvence za 39. aminokyselinou pomocí signální peptidasy I (Polderman-Tijmes et al. 2002a). Gen je v chromosomu *A. turbidans* lokalizován v oblasti genů zapojených do metabolismu aminosloučenin, ale funkce proteinu je prozatím neznámá.

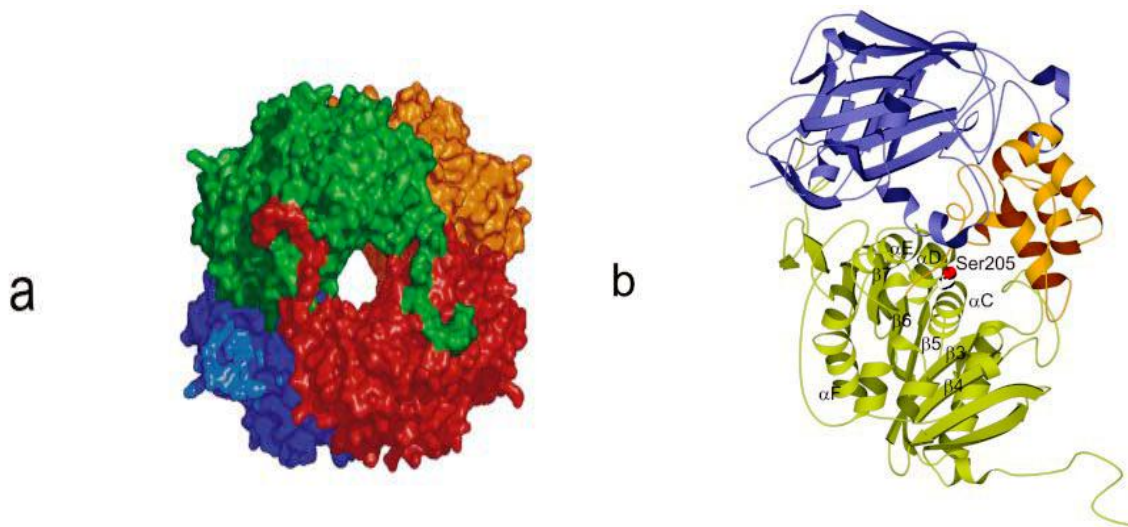
1.4.2.2 Protein

AEH patří do skupiny serin hydrolas, z velké skupiny X-prolyldipeptidylaminopeptidasy. Proteolyticky aktivní serin je v těchto proteasach v konzervované aminokyselinové sekvenci glycine-X-serin-threonine-X-glycine, kde „X“ je libovolná aminokyselina, ale katalytickou funkci zajišťuje triáda Ser – Asp – His. Na rozdíl od ostatních acylas pro biotransformace β -laktamů ovšem nepatří mezi Ntn-hydrolasy a to i přes velmi podobný mechanismus katalýzy. U AEH nebyl identifikován N-terminální serinový, threoninový nebo cysteinový zbytek, charakteristický pro Ntn-hydrolasy (Polderman-Tijmes 2002a; Suresh et al. 1999).

1.4.2.2.1 Nativní struktura

Aktivní enzym je tvořen více podjednotkami a studie nejsou jednotné v jejich počtu. AEH z *Acetobacter turbidans* je podle jedné práce dimerem s podjednotkami o velikosti 72kDa, ovšem jiná studie prokazuje, že tvoří tetramer (Polderman-Tijmes et al. 2002; Barends et al. 2006). Nativní AEH_{Act} vzniká z prekursoru o velikosti 74kDa (Polderman-Tijmes et al. 2002a). Ve starší literatuře se vyskytují články, v nichž je struktura AEH_{Act} tvořena heterodimerem, s podjednotkami 70 a 74kDa. Tyto výsledky byly pravděpodobně získány měřením enzymů, které neměly správně odštěpenou leader sekvenci (Polderman-Tijmes et al. 2002a). Mezi podjednotkami je prostor vyplněný vodou, kam se váže substrát.

AEH z *Xanthomonas citri* a *X. rubrilineans* tvoří tetramer s podjednotkami o velikosti 72kDa (Kato et al. 1980a; Sklyarenko et al. 2014). AEH_{Xc} je tetramer tvořený tak, že vždy dva monomery jsou vzájemně vázané svými N-terminálními doménami a vzniklé dimery jsou poté propojeny do tetrameru v oblasti C-terminální domény (Barends et al. 2003). Celý protein má přibližně tvar čtyřstěnu s vnitřní dutinou, která je vyplněná vodou a má dva otvory ven do prostoru (Barends et al. 2003) (Obr. 3). AEH_{Xc} a AEH_{Xr} vykazují vysokou míru homologie (83%), při srovnání s AEH_{Act} jde však již jen o cca 60% (Zarubina et al. 2013).



Obr. 3: a) Model struktury nativního tetrameru AEH_{Act}, každý z monomerů je znázorněn jinou barvou, b) Model struktury monomeru AEH_{Act}, žlutozeleně je znázorněná α/β-hydrolasová doména s raménkem, oranžová je „cap“ doména a modrá je „jelly-roll“ struktura (Barends et al. 2006).

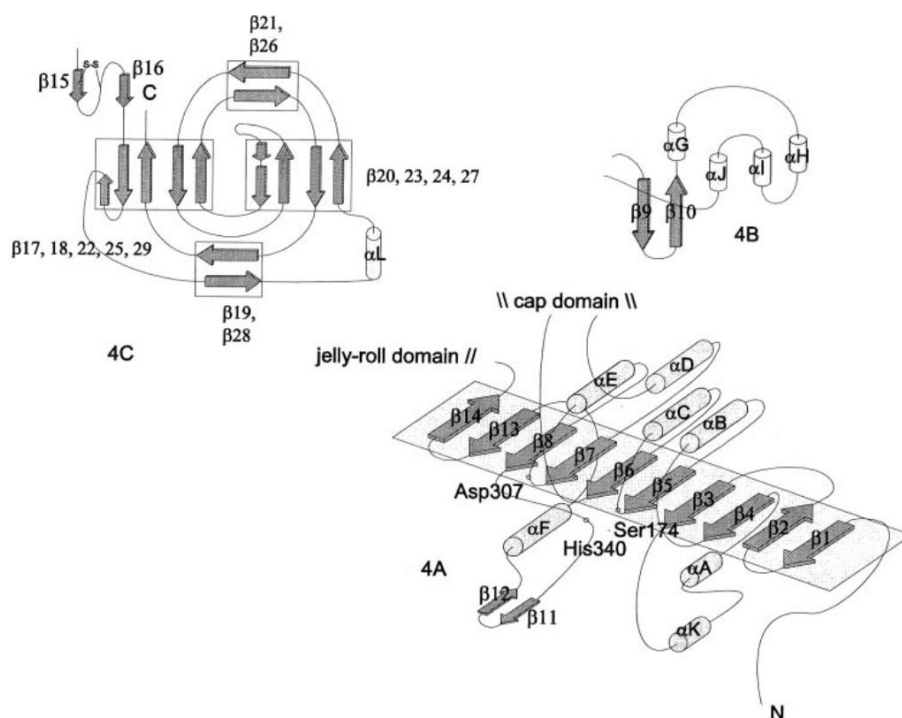
1.4.2.2.2 Struktura monomeru

Jednotlivé monomery AEH jsou identické a skládají se ze třech domén: N-terminální, „cap“ struktury a C-terminální.

N-terminální doména má funkci katalytickou i strukturní. Katalytická část formuje „ α/β hydrolase fold“ (Polderman-Tijmes et al. 2002b). „ α/β hydrolase fold“ je struktura aktivního místa a jeho okolí, která je charakteristická pro některé hydrolasy. Terciální struktura celého proteinu se u různých hydrolas s tímto motivem může lišit, ale podoba aktivního místa je konzervovaná (Obr. 4A). Tvoří jej triáda aminokyselinových zbytků složená z nukleofilu, histidinu a kyseliny a oxianionový otvor (Ollis et al. 1992). Strukturní rolí domény je vazba jednotlivých monomerů vzájemně k sobě. Konkrétní oblast, která podjednotky enzymu propojuje, je označována jako N-terminální raménko. V případě AEH_{Act} do N-terminální domény patří aminokyseliny 41 až 416. Po vytvoření dimeru se následně podílí na tvorbě vstupní části dutiny.

„Cap“ doména je malá α -helikální část proteinu, která se účastní vazby substrátu. Tato oblast odlišuje AEH od strukturně úzce příbuzných enzymů kokainesteras (Larsen et al. 2002). „Cap“ doména AEH je menší a umožňuje enzymu rozeznávat molekuly antibiotik jako substrát (Barends et al. 2003) (Obr. 4B).

C-terminální doména, která zahrnuje v AEH_{Act} aminokyseliny 417 – 667, nemá přesně známou funkci, je tvořena převážně β -listy, které tvoří tzv. „jelly-roll“ strukturu. Ze studia příbuzných proteinů lze předpokládat roli v substrátové specifitě a při zaujímání terciální struktury, neboť v této oblasti dochází k interakci s druhým dimerem při formování tetrameru (Polderman-Tijmes et al. 2002b) (Obr. 4C).



Obr. 4: Topologie jednotlivých domén monomeru AEH_x. 4A – N-terminální doména („α/β hydrolase fold“), 4B – Cap doména, 4C – C-terminální doména („jelly-roll“ struktura) (Barends et al. 2003).

1.4.2.2.3 Aktivní místo

Každý monomer má jedno aktivní místo na rozhraní jeho tří domén, takže celý enzym má čtyři (popř. dvě) nezávislé katalyticky aktivní struktury. Aktivní místo tvoří kanonická triáda Ser – Asp – His, které nejsou vedle sebe v rámci primární struktury proteinu, ale až po zaujetí nativní konformace proteinu. Triáda byla určena na základě srovnávání sekvencí příbuzných enzymů, jelikož „α/β hydrolase fold“ má silně konzervované úseky kolem katalyticky aktivních reziduí. Katalyticky aktivní serin byl identifikován také na základě hmotnostní spektrometrie fragmentů AEH, kdy byly katalytické aminokyseliny před štěpením chráněné vazbou s p-NPGB. Serin se nachází v takzvaném nukleofilním lokti a v kanonické triádě má roli nukleofilu (Polderman-Tijmes et al. 2002a).

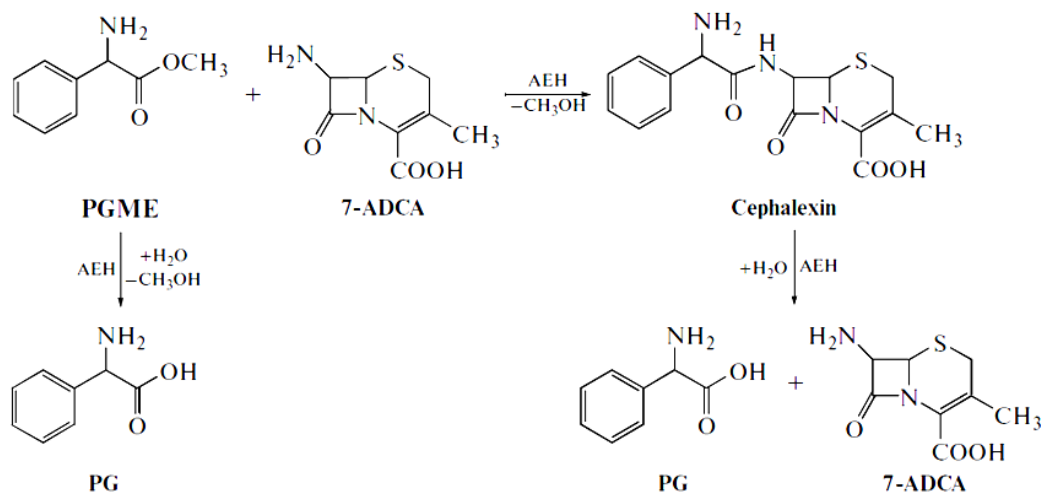
V blízkosti katalyticky aktivního histidinu se nachází karboxylátový klastr. Tvoří jej 3 karboxyskupiny, které poskytují 2 asparagové kyseliny a jedna kyselina glutamová. Tento klastr nese celkový negativní náboj a rozeznává pozitivně nabitou α-aminoskupinu substrátu, čímž určuje substrátovou specifitu enzymu a koriguje orientaci substrátu. Je konzervovaný ve všech AEH a jeho identifikace pomáhá odlišit AEH od ostatních příbuzných enzymů jako

kokainesterasy či glutarylacylasy (Barends et al. 2003; Zarubina et al. 2013). Esenciální funkce této struktury pro hydrolytickou aktivitu byla ověřena experimentem s cílenou mutagenézí aminokyselinových zbytků, které patří do tohoto klastru. Všechny aminokyseliny byly změněny na alanin a to jak jednotlivě, tak i jako dvojité či trojitá mutace. Všechny mutantní enzymy byly úspěšně exprimovány a izolovány, ale vykazovaly nulovou nebo zcela zanedbatelnou hydrolytickou aktivitu na ampicilin i cefalexin (Blum a Bommarius 2010).

Katalyticky aktivní aminokyseliny jsou orientovány tak, že směřují do vnitřní dutiny. Orientace dovnitř kavity ovlivňuje substrátovou specifitu enzymu, takže AEH mohou reagovat pouze s malými molekulami. Tato dutina vzniká spojením podjednotek dimeru, popř. tetrameru, a je vyplněna vodou, která se podílí na stabilizaci náboje na aktivním serinu. Voda je v dutině udržována ve správné pozici vazbou vodíkových můstků mezi molekulou vody a dvěma molekulami tyrosinu z AEH. Tato stabilizace pomocí tyrosinu je výjimečná, protože ostatní enzymy s touto strukturou využívají jiné aminokyseliny. Dutina je označována jako oxyanionová, protože záporně nabitý kyslík má důležitou roli pro katalytickou aktivitu enzymu (Barends et al. 2003).

1.4.3 Průmyslové využití AEH

AEH jsou v poslední době intenzivně zkoumány, protože by potenciálně mohly nahradit penicilinacylasy v průmyslové produkci semi-syntetických antibiotik. AEH katalyzují stejné reakce jako PGA. Nejen syntetickou reakci při výrobě antibiotik, ale také obě hydrolytické postranní reakce (hydrolýzu esterové vazby v acyldonoru a acylamidové vazby na nově syntetizovaném antibiotiku) (Obr. 5). Lze tedy říct, že AEH mají syntetasovou, esterasovou a amidasovou aktivitu, přičemž konzervovaný poměr mezi těmito aktivitami činí přibližně 2:5:1. Využívá se syntetasová (příprava semisyntetických β -laktamů) a amidasová aktivita (hydrolýza antibiotika se využívá k přípravě 6-APA, 7-ACA a 7-ADCA – Takahashi et al. 1974), vysoká esterasová aktivita (hydrolýza acyldonoru) je nežádoucí.



Obr. 5: Schéma syntézy cefalexinu, pomocí AEH, a to včetně hydrolytických reakcí (Sklyarenko et al. 2014).

AEH reaguje pouze s acyldonory, které mají na α - C volnou aminoskupinu takže jako substráty není možné použít acyldonory, které mají aminoskupinu na β nebo γ - C, stejně jako pokud je na α - C jiná funkční skupina než aminoskupina. Z experimentů, kde byly použity nejrůznější acyldonory vyplývá, že AEH je nejvýhodnější používat k syntéze antibiotik, které mají v postranním řetězci zbytek D-fenylglycinu (D-PG), či D-hydroxyfenylglycinu (D-HPG). Takto vznikají ampicilin, cephalexin, amoxicilin a cefadroxil. Všechny AEH reagují se všemi typy jader β -laktamů, ne však stejně dobře. AEH_{Act} preferuje 6-APA a naopak AEH_{Xc} reaguje lépe s 7-ADCA (Kato et al. 1980b; Takahashi et al. 1974).

AEH vykazují stereospecifitu, která ovšem není absolutní a také se u různých enzymů liší. Enzymy mohou preferovat D- i L- stereoizomery, AEH_{Act} je D- selektivní (Fernandez-Lafuente et al. 2001), oproti tomu AEH z *X. rubrilineans* reaguje až 300x rychleji s L-stereoisomery (Krestyanova et al. 1990).

Pro syntézu antibiotik je důležité, že AEH preferují jako substrát estery oproti amidům. AEH izolovaná z *A. turbidans* využívá při syntetické reakci methylesterfenylglycinu až 45x selektivněji než příslušný amid (cephalexin), což umožňuje hromadění nově syntetizovaných antibiotik, aniž by musela být rovnováha reakce uměle udržována ve prospěch syntézy odebráním produktů (Takahashi et al. 1974; Polderman-Tijmes et al. 2002).

Zároveň AEH mají oproti penicilinacylasam výhodnější mírně kyselé pH optimum (alkalické prostředí, které vyžadují penicilinacylasy destabilizuje β -laktamová jádra – Cole 1969a) a nejsou ani inhibované kyselinou fenyloctovou (Blinkovsky a Markaryan 1993).

1.5 Bakteriální expresní systémy

Funkční bakteriální systémy jsou založeny na různých druzích bakterií: *Escherichia coli* BL21 (Makrides 1996), *Bacillus brevis* (Udaka a Yamagata 1993), *B. subtilis* (Ulmanen et al. 1985), *Caulobacter crescentus* (Bingle, Nomellini, a Smit 2000), *Lactococcus lactis* (Morello et al. 2008), *Pseudomonas fluorescens* (Huang et al. 2007), *P. aeruginosa* (Derouazi et al. 2008; Krzeslak et al. 2009), *P. putida* (Dammeyer et al. 2011) a jsou popsány i systémy ve *Streptomyces* (Vrancken a Anne 2009) či *Corynebacterium* (Itaya a Kikuchi 2008). Základní požadavky kladené na bakteriální expresní systémy jsou: řízená exprese heterologního proteinu, prototrofní hostitelský organismus, rychlý růst, vysoká exprese, správné formování nativní struktury heterologních proteinů apod.

První volbou hostitelského kmene je obvykle *E. coli*, neboť je tato bakterie je schopná velmi rychle růst na levných médiích a dosáhnout vysokých optických denzit, má prozkoumaný genom a detailně popsáný metabolismus, což spolu s množstvím vyvinutých metod pro její modifikaci usnadňuje tvorbu expresního systému a jeho následnou optimalizaci (Chen 2012; Terpe 2006).

Mezi nevýhody patří, že tento expresní systém obvykle nemůže být použit pro expresi proteinů s posttranslačními modifikacemi, ale byly prokázány případy přirozené glykosylace některých bakteriálních proteinů (Wacker et al. 2002; Feldman et al. 2005; Wacker et al. 2006). Ihssen et al. (2010) dokázali vytvořit expresní systém v *E. coli*, který produkoval nativní fúzní glykoprotein a Lizak et al. (2011) úspěšně produkovali N-glykosylované protilátky ve velkých objemech. N-acetylace heterologních proteinů byla dosažena vytvořením fúzního proteinu s vhodnou acetyltransferasou (Acharya et al. 2005), zvýšením exprese acetylačního aparátu vlastního *E. coli* (Fang et al. 2009; Ren et al. 2011) nebo byl hostitelskému kmenu dodáván acetyllysin a ten byl následně inkorporován do vznikajícího proteinu (Neumann et al. 2008). Získání fosforylovaných rekombinantních proteinů lze dosáhnout podobným způsobem (Murata et al. 2008).

Použití antibiotik jako selekčních markerů je další nevýhodou expresního systému v *E. coli* nejen pro svou cenu, ale také kvůli potenciálnímu nebezpečí šíření genů pro rezistenci.

Systém, který nevyžaduje použití antibiotik, byl vytvořen poškozením jednoho esenciálního genu na chromosomální DNA hostitele a vložení tohoto genu do DNA plasmidu. Byl využit gen pro iniciační faktor InfA (Hagg et al. 2004), či gen z anabolické dráhy (Kroll et al. 2009; Kroll et al. 2010; Kroll et al. 2011). Alternativní možností je inkorporace toxinu do chromosomu hostitele a antitoxinu do DNA plasmidu (Peubez et al. 2010). Všechny výše popsané systémy vykazují vyšší stabilitu vloženého plasmidu než systémy využívající antibiotika.

Bakteriální expresní systémy mohou tvořit inkluzní tělíska složená z exprimovaného proteinu, jejichž mechanismus vzniku není přesně známý (Carrio et al. 2000). Agregaci inkluzních tělísek lze částečně předcházet změnami kultivačních parametrů: teploty, míry exprese, cíleným proteinovým inženýrstvím (připojení specifických značek („tags“), či souběžnou expresí chaperonů (Jonasson et al. 2002).

Hostitelský kmen *E. coli* a vektor jsou často komerčně dostupné a připravené tak, aby byly geneticky kompatibilní a aby systém produkoval co největší množství nativního proteinu. Velmi často používaný hostitelský kmen *E. coli* BL21 je modifikovaný tak, aby rychle rostl na minimálním médiu, byl nepatogenní a zároveň umožňoval stabilní expresi genů na plasmidu (Chart et al. 2000). Kmen *E. coli* BL21(DE3) má navíc delece v genech pro hlavní bakteriální proteasy OmpT a Lon, které interferují s izolací intaktního rekombinantního proteinu (Phillips et al. 1984).

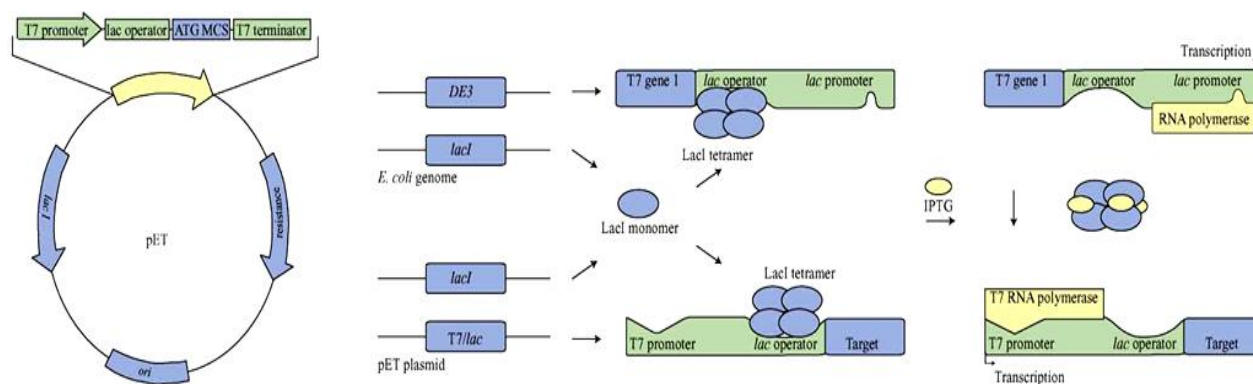
1.5.1 Expresní systém v *Escherichia coli* BL21(DE3)

Vektory expresního systému musí obsahovat tyto základní komponenty: začátek replikace (*ori*), selekční marker (nejčastěji rezistence na antibiotika) a mnohočetné klonovací místo (MCS), promotor, terminátor, vazebné místo pro ribosom (RBS). Všechny tyto genetické elementy ovlivňují vlastnosti plasmidu. *Ori* zajišťuje semi-autonomní replikaci plasmidů a ovlivňuje počet kopií plasmidů v buňce tzv. „copy number“ (Baneyx 1999). Selekční marker slouží pro výběr buněk po transformaci, které mají vložený rekombinantní plasmid. Mnohočetné klonovací místo je oblast s vysokou hustotou sekvencí rozeznávaných restrikcí endonukleasami a do tohoto místa je vkládán insert.

Expresní systém pET byl vyvinut jako univerzální expresní systém pro expresi různých rekombinantních proteinů skupinou Studier et al (1990). Plasmidy tohoto systému obsahují hybridní promotory, mnohočetná klonovací místa, nejrozličnější fúzní proteiny a místa rozeznávaná

specifickými proteasami. Chromosom hostitelského kmenu *E. coli* musí obsahovat fragment chromosomu z bakteriofága (oblast DE3) kódující T7 RNA polymerasu. Polymerasa je pod kontrolou indukovatelného protomeru *lacUV5*. Často je také na chromosomu hostitelského kmene i na expresním plasmidu represor *lac* operátoru (*lacI*) (Studier et al. 1990; Studier 1991).

Ve vektoru pET je hybridní T7/*lac* promotor, díky tomu je exprese rekombinantního proteinu podmíněna expresí T7 RNA polymerasy a zároveň přítomností induktoru (laktózy nebo jejího analogu). LacI brání aktivaci promotorů na plasmidu i chromosomu do okamžiku indukce, kdy je komplex LacI induktor uvolněn z DNA a je zahájena exprese T7 RNA polymerasy, která následně přepisuje rekombinantní protein (Obr. 6). V některých případech je nežádoucí i malá bazální transkripce rekombinantního proteinu, v tom případě je možné využít hostitelský kmen, který produkuje T7 lysosym. To je gen pro amidasu z bakteriofága T7, která přirozeně reprimuje T7 RNA polymerasu. Gen pro T7 lysosym je obvykle kódován na plasmidu pLysS (silent) nebo pLysE (expressed). Po indukci exprese T7 polymerasy jí vzniká velké množství, které lysosym nemůže úplně inhibovat a rekombinantní protein je exprimován (Sorensen a Mortensen 2005). Více informací o pET systému a typech dostupných vektorů lze najít v pET systém repertoriu (Novagen Turner strains).



Obr. 6: Schéma expresního systému pET. Vpravo je znázorněna inhibice, popř. aktivace exprese v závislosti na přítomnosti IPTG (Sorensen a Mortensen 2005).

1.5.2 Expresní systémy pro AEH

Bakteriální expresní systémy byly vytvořeny pouze pro 4 enzymy: AEH_{Act} , AEH_{Xc} , AEH_{Xr} a glutarylacylasa (GAA) z rodu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Tuto

glutarylacylasu uvádím z toho důvodu, že, ačkoliv je anotována jako glutaryl-7-ADCA-acylasa, byly u ní byly identifikovány všechny 3 znaky, které jsou považovány za charakteristické pro AEH. Její aktivní místo je tvořeno konzervovanou katalytickou triádou Asp – Ser – His, byl zde identifikován karboxylátový klastr a v nativním proteinu je oxyaninová dutina. Gen *gaa* vykazuje 89% homologii s ostatními AEH, u proteinové sekvence je to dokonce 93%. Kompletní gen je dlouhý 1914 nukleotidů a dává vznik polypeptidu s 637 aminokyselinami, tj. signální sekvence (22 aminokyselin) a strukturní podjednotka (615 aminokyselin). Molekulová váha GAA je 68kDa (Blum a Bommarius 2010).

Tento gen byl použit pro tvorbu expresního systému v hostiteli *E. coli* BL21(DE3)pLysS, do něž byl transformován rekombinantní plasmid pET28 s *gaa*. Experimentálně bylo ověřeno, že je možné použít C-terminální His-tag, aniž by to ovlivnilo expresi a funkci GAA. Rekombinantní *E. coli* BL21(DE3)pLysS produkující GAA byl kultivován v baňkách a pro purifikaci GAA byl využit C-terminální His-tag. Rekombinantní GAA byla použita při hydrolýze ampicilinu (získaná data jsou v tabulce č. 1), zatímco pro hydrolýzu penicilinu G nebyla neměřena žádná aktivita (Blum a Bommarius 2010).

Všechny typy rekombinantních systémů vytvořených pro AEH z různých organismů jsou porovnány v tabulce 1, kinetické parametry byly stanovené s ohledem na hydrolýzu ampicilinu. Podrobné informace o struktuře AEH_{Act}, AEH_{Xc}, AEH_{Xr} jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách o genu a proteinu viz. výše.

Tabulka č. 1: Kinetické parametry hydrolýzy ampicilinu u rekombinantních systémů pro AEH.

Původní organismus	Expresní systém	K_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	Citace
<i>Acetobacter turbidans</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS, vektor pET-9	162	1,0	(Polderman-Tijmes et al. 2002a)
<i>Xanthomonas citri</i>	<i>E. coli</i> HB101, vektor pEC	58	1,2	(Barends et al. 2003)
<i>Xanthomonas rubrilineans</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3), vektor pET-28a (+)	-	-	(Wang et al. 2012)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS, vektor pET-28	72,5	1,1	(Blum a Bommarius 2010)

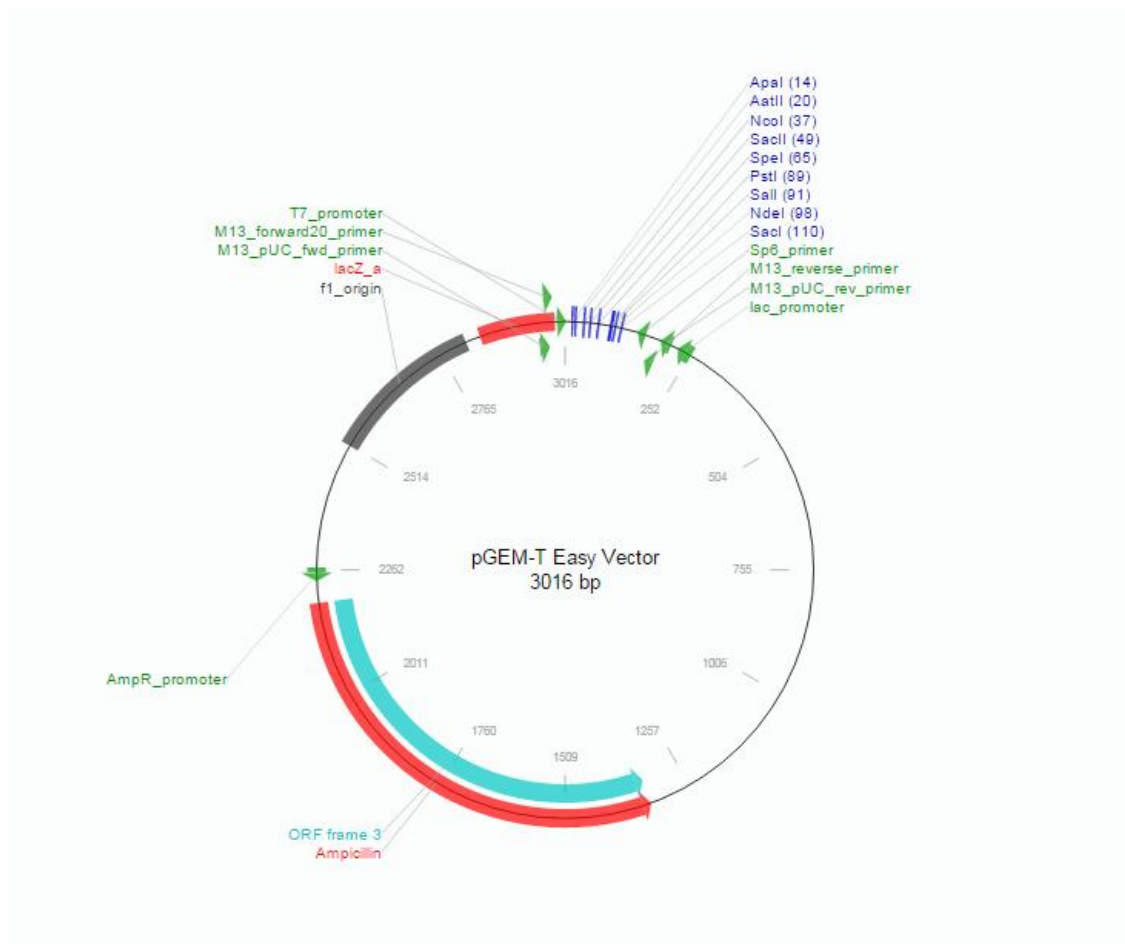
2. Cíle práce

1. Konstrukce bakteriálního expresního systému produkujícího AEH
 - Amplifikace strukturního genu *aeH_{Asp}* z rekombinantního plasmidu nesoucího fragment chromosomální DNA *Achromobacter* sp. CCM 4824
 - Subklonování *aeH_{Asp}* genu v klonovacím a expresním vektoru
 - Vytvoření expresního systému pro heterologní expresi *aeH_{Asp}* založeném na hostitelském kmeni *Escherichia coli* BL1(DE3)
2. Produkce a charakterizace rekombinantního enzymu AEH_{Asp}
 - Produkční kultivace rekombinantního systému v laboratorním míchaném bioreaktoru
 - Purifikace rekombinantního enzymu AEH_{Asp} a stanovení jeho základních vlastností

4. Materiál

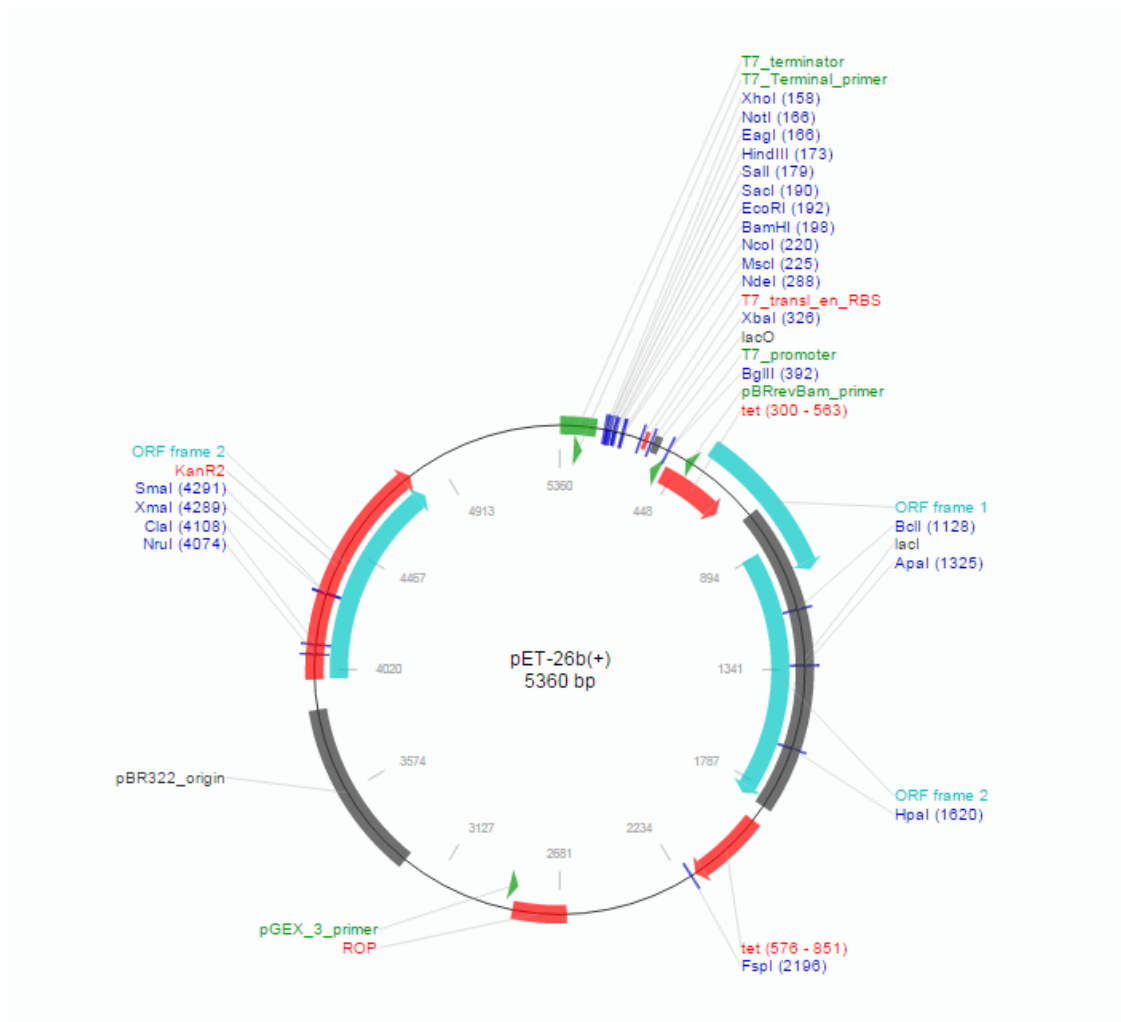
4.1 Plasmidy a DNA

- pGEM-T_{Easy}TM: komerčně dostupný vektor (Promega, USA) (Obr. 7)



Obr. 7: Mapa plasmidu pGEM-T_{Easy}TM (Promega, USA) Zdroj www.addgene.org.

- pET-26b (+): komerčně dostupný vektor (Novagen, Německo) (Obr. 8)



Obr. 8: Mapa plasmidu pET-26b (+) (Novagen, Německo) Zdroj www.addgene.org.

- pKAMP: vektor pK19 (mnohakopiový vektor s resistencí na kanamycin) (Life Technologies, USA) s vloženým neznámým úsekem chromosomální DNA organismu *Achromobacter* sp. CCM 4824 (Plháčková et al. 2003)

Plasmid pKAMP byl zkonstruován ligací Sau3AI-fragmentů DNA po parciálním štěpení chromosomální DNA_{Asp} restriční endonukleasou Sau 3AI do vektoru pK19. Ligační směsí byly transformovány bakterie *Escherichia coli* DH5α a ve vytvořené knihovně byly hledány klony s hydrolytickou aktivitou na penicilin G, popř. ampicilin.

Screening pozitivních kolonií byl prováděn na základě kolorimetrické reakce produktu hydrolýzy penicilinu G / ampicilinu s DAB a byl identifikován klon se slabou hydrolytickou aktivitou k ampicilinu.

- Sekvence části genu pro AEH_{Asp}:

Z rekombinantního plasmidu pKAMP bylo v rámci předchozích experimentů amplifikováno a osekvenováno 500 nt. Ze známé sekvence byla navržena sada primerů Upkons1, Upkons2, Revkons1, Revkons2.

4.2 Primery

Tabulka 2: Oligolukleotidy použité pro PCR amplifikace či sekvenace.

Název primeru	Sekvence (od 5' ke 3' konci)
UpAcet2	ATGACAGGCTCGTCCTATGAGG
RevAcet1	CGCCAGGGGCCCATCACCAG
Upkons1	GTACGGCTCGGAAGGAGACTACG
Upkons2	ATGATCGGCTCCTCGTATGAAG
Revkons1	TAGATAAGGACAGGCGGTGTGT
Revkons2	GGGTTGCGGTCTGACAGTGGA
FwdProt1	AACGCCCCGATHCTNYTNACNCG
FwdProt2	CTGCCGCAGGGCGAYGARGTNTTYGT
FwdProt3	GGCGACTACGTGATGACNCGNCC
FwdProt4	TTCACCGTGGTCATGGCNYTNACNGA
RevProt5	GCGCCACGGGGCCCATNACNARRTARTT
RevProt6	CTGCAGGGCNGTRTCNCCRTCRAA
RevProt7	GTCCCAGTGGTTYNCCNGTRTTRTA
RevProt8	AGCGACGAYTGNACYTGNACCATNAC
FwdSTEN_Nde2	GGGTTGCATATGTCCATGCGTGTGCGTGCCGTTGCTGTTGC
FwdSTEN_ATGless2	TCCATGTGTGTGCGTGCCGTTGCTGTTGC
RevSTEN_EcoRI2	GAATTCTTAGTACACCGGCAGTTCGATGTAGC
RevSTEN_STOPXba2	TCTAGATTAGTACACCGGCAGTTCGATGTAGC
Fwd primer T7	TAATACGACTCACTATAGG
Rev primer T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
M13/pUC sekvenacni primer (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13/pUC reverzni sekvenacni primer (-26)	CAGGAAACAGCTATGAC

4.3 Markery

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA)

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (Bio-Rad, USA)

4.4 Mikroorganismy

Escherichia coli BL21(DE3) – genotype: F⁻ *ompT* *hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3) (Invitrogen, USA).

Escherichia coli TOP10 – genotype: *hsdR*, *mcrA*, *lacZ*ΔM15, *endA1*, *recA1* (Life Technologies, USA).

4.5 Kultivační media

LB (Luria Bertani) medium: 5% (w/v) kvasinkový lyzát (Oxoid, Velká Británie), 10% (w/v) Trypton (Becton Dickinson, USA), 5% (w/v) NaCl, pH 7,2 – 7,5. Popř. pro pevné medium přidáno 15g agaru do 1 litru media.

MYEGly I medium: 0,4% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 1,4% (w/v) KH₂PO₄, 0,3% (w/v) NaOH, 1% (w/v) kvasinkový lyzát, 1% (w/v) glycerol, pH 7.0

MYEGly II medium: 0,4% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 1,4% (w/v) KH₂PO₄, 0,3% (w/v) NaOH, 0,4% (w/v) kvasinkový lyzát, 1.5% (w/v) glycerol, pH 7.0

Zásobní roztoky stopových prvků:

0,5% (w/v) CaCl₂·2H₂O

0,1% (w/v) FeSO₄·7H₂O

2% (w/v) MgSO₄·7H₂O

Roztok zdroje uhlíku: 40% (w/v) glycerol

Zásobní roztok induktoru: 10% (w/v) laktosa

Vše rozpuštěno v destilované vodě a autoklávováno 90 minut v teplotě 121°C.

4.6 Použité enzymy

Ligasa: T4 DNA ligase 5 U/μl (Fermentas, Litva)

Lysozyme: Lysozyme 100 000 U/mg, zásobní roztok 50 mg/ml (Serva, Německo)

Polymerasy: Herculase II Fusion 5 U/μl (Agilent, USA)

Restriktasy: *Nde*I a *Eco*RI – HF[®] 10 U/μl (New England BioLabs Inc., Velká Británie)

4.7 Pufry a roztoky

Acetát MOPS: 0,10 M octan sodný, 0,05 M MOPS, pH 8,0

Ampicilin: zásobní roztok 100 mg/ml, do médií používáno 100 μ l Amp na 100 ml media (Sigma Aldrich, USA)

DAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyd): zásobní roztok 0,5% DAB (w/v) v methanolu (Sigma Aldrich, USA)

0,1 M Fosfátový pufr: 11,52 g/L H_3PO_4 (85%), pH 7,0 upraveno NaOH

0,01 M Fosfátový pufr: 1,152 g/L H_3PO_4 (85%), pH 7,0 upraveno NaOH

Kanamycin: zásobní roztok 50 mg/ml, do médií používáno 100 μ l Km na 100 ml media (Sigma Aldrich, USA)

STOP směs: 20% (w/v) kyselina octová, 0,05 M NaOH

TBE pufr: 45 mM Tris-HCl, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA, pH 8,0

Tris-HCl: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Není-li uvedeno jinak, jsou roztoky připraveny rozpuštěním v destilované H_2O .

4.8 Chemikálie

Agar (Difco, USA)

Agarose (Serva, Germany)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)

DMSO (Agilent, USA)

dNTP Mix 50 mM (Agilent, USA)

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol čistota pro UV spektroskopii (Lach-Ner, ČR)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)

Glycerol (Lach-Ner, ČR)

H_3BO_3 (Lach-Ner, ČR)

Hydroxid amonný (Lach-Ner, ČR)

Hydroxid draselný (Lach-Ner, ČR)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)

Chlorid draselný (Lach-Ner, ČR)

Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
 KH_2PO_4 (Lach-Ner, ČR)
Kyselina 3,5-dinitrosalicylová (Lach-Ner, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
Laktosa (Lach-Ner, ČR)
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner, ČR)
MOPS (morfolinopropansulfonová kyselina) (Serva, Německo)
 Na_2HPO_4 (Lach-Ner, ČR)
 NaH_2PO_4 (Lach-Ner, ČR)
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Lach-Ner, ČR)
Octan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
SDS (dodecylsulfát sodný) (Serva, Německo)
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) (Lach-Ner, ČR)
Vinan sodnodraselný (Lach-Ner, ČR)

5. Metody

5.1. Izolace plasmidové DNA

Po 12 – 16 hodinové kultivaci byly 2 ml tekuté kultury stočeny při 23 000xg po dobu 2 minut, medium bylo odsáto a buněčný pelet zamražen na minimálně 2 hodiny v -20°C. Pelet byl resuspendován ve 200 µl roztoku „P1“ s 5 µl lysosymu (Life Technologies, USA). Pro lyzování byly buňky ponechány v 37°C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 400 µl roztoku „P2“, roztok byl inkubován přesně 5 minut v laboratorní teplotě a bylo přidáno 300 µl roztoku P3. Směs byla inkubována 15 minut v 0°C a následně byly zkumavky stočeny při 23 000xg po dobu 7 minut.

710 µl supernatantu bylo odebráno do čisté mikrozukavky a promícháno s dvojnásobným množstvím koncentrovaného ethanolu (1 420 µl, 99,8%). Směs s ethanolem byla opět inkubována 15 minut v 0°C a následně stočena (23 000xg, 7 minut). Vzorky byly zbaveny ethanolu odsátím supernatantu a pelet byl rozpuštěn ve 100 µl acetátu MOPS, následně byl rozpuštěný pelet dobře promíchán s 200 µl koncentrovaného ethanolu (99,8%). Po inkubaci v 0°C po dobu 15 minut byla směs opět centrifugována (23 000xg, 7 minut) a ethanol pečlivě odstraněn nejprve odsátím a poté ponecháním otevřených zkumavek pro odpaření zbytku. DNA byla rozpuštěna v 50 µl pufru Tris-HCl (Birnboim a Doly 1979).

Pro stáčení byla vždy používána centrifuga Eppendorf centrifuge 5403 (Eppendorf, Německo), pro inkubaci v teplotě 37°C byl vzorek umístěn do thermoboxu Biological thermostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR).

Použité pufrы:

P1 (Qiagen, Germany) + 1,5% lysozym: 50 mM Tris-Cl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µg/ml ribonukleasa A, pH 8,0

P2 (Qiagen, Germany): 200 mM NaOH, 1% SDS roztok

P3 (Qiagen, Germany): 3,0 M octan draselný, pH 5,5

5.2. PCR

5.2.1 Návrh primerů

Všechny primery, které byly používány v experimentech, byly navrženy pomocí počítačového programu PrimerSelect (DNASTAR). Sekvence genů, které byly použity pro

vytvoření primerů, byly získány z veřejně přístupné mezinárodní databáze NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.2.2 PCR amplifikace strukturního genu

Reakční směs byla namíchána v 0,5ml mikrozkuřavkách a probíhala v C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Teplota nasedání primerů byla volena podle délky obou primerů a zastoupení GC párů v jejich sekvenci, pro stanovení optimální teploty tání primerů byl použit program PrimerSelect (DNASTAR).

Reakční směs pro PCR: (celkový objem 40 μ l)

PCR H ₂ O	19 μ l
5x polymerase pufr	10 μ l
dNTPs (2 mM)	5 μ l
Fwd primer NdeI	2,5 μ l
Rev primer EcoRI	2,5 μ l
Polymerasa	0,5 μ l
Templátová DNA	0,5 μ l

Průběh reakce:

Iničiační denaturace 98°C (30 s), 35 cyklů 98°C (10 s) - 50°C (10 s) - 72°C (90 s), ukončení syntézy 72°C (10 minut). Do odebrání vzorků udržování teploty 4°C. Vzorky byly okamžitě použity, nebo uschovány v -20°C.

5.2.3 Adenylace 3' konců PCR amplikonů

Reakce probíhala v 0,5ml mikrozkuřavkách (Eppendorf, Německo) v PCR cycleru C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), který udržoval teplotu 72°C po dobu 30 minut. Pro tuto reakci byla používána GoTaq Polymerase (Promega, USA).

Reakční směs pro adenylaci 3' konců: (50 μ l)

DNA	39 μ l
5x GoTaq polymerase buffer	10 μ l
dNTP	1 μ l
GoTaq polymerase	0,25 μ l

5.2.4 Colony PCR

Jako templát byly použity celé kolonie buněk, které byly přidávány do reakční směsi nabráním na párátko a resuspendováním. Amplifikace probíhala pomocí Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs Inc., Velká Británie). Zároveň se vnesením buněk do reakční směsi byly buňky přeneseny na pevné LB medium s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc v teplotě 37°C.

Reakční směs pro Colony PCR: (jedna kolonie do 10 µl reakční směsi)

PCR H ₂ O	4 µl
5x Q5 polymerase pufr	2 µl
Q5 GC enhancer	2 µl
dNTPs	1 µl
Fwd primer pET UP2	0,5 µl
Rev primer T7 terminator	0,5 µl
Q5 polymerase	0,075 µl

Průběh reakce:

Iničiační denaturace 98°C (30 s), 35 cyklů 98°C (10 s) - 56°C (10 s) - 72°C (90 s), ukončení syntézy 72°C (10 minut). Do odebrání vzorků udržování teploty 4°C. Vzorky byly okamžitě použity nebo uschovány v -20°C.

5.3 Sekvenace DNA

DNA pro sekvenaci byla zpracována ve Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu AVČR, v.v.i.

5.4 Elektroforetická analýza

5.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza

Tato elektroforéza byla používána pro detekci a analýzu úseků DNA, standardně byl používán TBE pufr. Gel byl připravován rozvařením agarosy v TBE pufru, koncentrace byla volena podle očekávané velikosti fragmentů (nejčastěji 0,7% (w/v) pro vizualizaci fragmentů délky přibližně 2 000 nukleotidů).

Vzorek byl nanášen do jednotlivých jamek v gelu ve směsi s 6x DNA Loading Dye (1 µl 6x Loading Dye / 10 µl vzorku, Thermo Scientific, USA). DNA byla standardně značena

GelRed™ (Biotium, USA). Gel byl barven GelRed™ až po rozdělení DNA. Elektroforéza probíhala při napětí 5,6 V/cm přibližně 60 minut. Elektroforetogramy byly snímány dokumentačním systémem Gel Logic 200 (Kodak, USA). Další zpracování probíhalo pomocí počítačového programu Kodak MI - Molecular Imaging System.

Složení gelu: (0,7% agarosa)

Agarose	0,21 g
TBE	30 ml

5.4.1.1 Izolace z gelu

DNA vybrané velikosti byla po rozdělení vyříznuta skalpelem a byla izolována pomocí komerčního kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko), popř. High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švýcarsko).

5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek byla používána pro separaci a vizualizaci proteinů ve vzorcích. Elektroforéza byla prováděna ve standardním Tris-glycinovém uspořádání dle Laemmliho (Laemmli 1970).

Používán byl polyakrylamidový gel tvořený 12% separačním gelem a 5% zaostřovacím gelem. Elektroforéza byla prováděna na soupravě Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA) při 80 V do zaostření vzorků na rozhraní gelů a poté bylo napětí zvýšeno na 100 V a udržováno po dobu 60 – 120 min. Když čelo separace dorazilo ke konci gelu, byla elektroforéza ukončena a gely byly obarveny 20 minut v barvicím roztoku Comassie Brilliant Blue R-250 a potom odbarveny v odbarvovacím roztoku (Schaeffer 2006).

Jednotlivé složky	12% separační gel (ml)	5% zaostřovací gel (ml)
H ₂ O	3,3	2,7
30% směs akrylamidu	4,0	0,67
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5	-
1,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,5
10% SDS	0,1	0,04
10% Persíran amonný	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,004

Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris – Cl, 0,192 M glycin, 0,1% SDS. pH upraveno na 8,3.

Barvicí roztok: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R – 250, 90 ml methanol : H₂O (1:1 v/v), 10 ml koncentrované kyseliny octové

Odbarvovací roztok: 450 ml methanolu, 450 ml H₂O, 100 ml koncentrované kyseliny octové

5.4.2.1 Příprava vzorků pro SDS – PAGE

SDS-PAGE vzorky (10 µl) byly smíchány s nanášecím pufrem (2,5 µl) a po inkubaci (5 min) v teplotě 95°C v suchém bločku 17600 Dri-Bath Thermolyne (Thermo Scientific, USA) nanášeny na gel pomocí mikrostříkačky Hamilton.

Nanášecí pufr (5x koncentrovaný): 50% (w/v) glycerol, 10% SDS, 250 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM DTT, 0,5% bromfenolová modř (w/v)

5.5 Restrikce

Před restrikcí byla DNA vždy přečištěna, aby byly odstraněny enzymy, pufrы a další reakční činidla. Purifikace lineární DNA byla provedena komerčním kitem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko), pro cirkulární DNA byl použit High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švýcarsko). Pro restrikci byly používány komerčně dostupné restrikční endonukleázy s pufem CutSmart® Buffer (New England BioLabs Inc., Velká Británie) a reakce probíhala v mikrozkuřavkách 120 minut v 37°C v suchém bloku 17600 Dri-Bath Thermolyne (Thermo Scientific, USA).

Reakční směs pro restrikci: (50 µl)

Plasmid/PCR produkt	43 µl
CutSmart pufr	5 µl
<i>Nde</i> I	1 µl
<i>Eco</i> RI	1 µl

5.6 Ligace

K ligaci byl používán enzym T4 DNA ligase 5 U/µl (Fermentas, USA) a k ní komerčně dodávaný reakční pufr 10x T4 DNA ligase buffer (Fermentas, USA). Reakční směs byla namíchána v mikrozkuřavkách.

Reakční směs pro ligaci do vektoru pGEM-T_{Easy}TM (Promega, USA): (11 µl)

DNA (insert)	8,7 µl
Vektor	0,3 µl
10x Ligační pufr	1 µl
Ligasa	1 µl

Ligace probíhala 3 hodiny v laboratorní teplotě.

Reakční směs pro ligaci do vektoru pET-26b (+): (30 µl)

Deionizovaná H ₂ O	16,5 µl
DNA (insert)	8 µl
Vektor	2 µl
10x Ligační pufr	3 µl
Ligasa	0,5 µl

Ligace probíhala přes noc při 12°C.

5.7 Transformace kompetentních buněk

Transformace kompetentních buněk byla prováděna metodou teplotního šoku. K 125 µl pomalu rozmraženým kompetentním buňkám byl přidán 1 µl rekombinantních plasmidů, nebo 10 µl ligační směsi a suspenze byla inkubována v ledu po dobu 30 minut. Následně byl proveden teplotní šok v suchém bloku 17600 Dri-Bath ThermolyneTM (ThermoScientific, USA) o teplotě 42 – 43°C na 45 sekund a poté byly mikrozkušavky umístěny zpět na led na 5 minut. Regenerace buněk po teplotním šoku probíhala přidáním 400 µl sterilního LB media a inkubací po dobu 60 minut v 37°C ve vyhřívané třepačce Orbital Incubator Illuminated Cooled Gallenkamp (Fistreem International Ltd., Velká Británie), intenzita třepání byla 3,33 Hz. Poté byla suspenze po 130 µl vyseta na Petriho misky s pevným LB médiem, doplněném o odpovídající antibiotikum jako selekční marker. Kultivace poté probíhala přes noc v 37°C a thermoboxu Biological thermostat BT – 200 (Laboratorní přístroje Praha, ČR).

5.7.1 Příprava chemicky kompetentních buněk

Čerstvě zaočkovaná kultura buněk byla kultivována v baňce za stálého míchání 3,33 Hz při teplotě 37°C do OD₆₀₀ 0,5. Poté byl 1 ml buněčné kultury stočen (4 500xg, 10 minut), supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 0,5 ml 0,1 M sterilního ledového CaCl₂ a ponechán 30 minut na ledu. Následně byly buňky stočeny (4500xg, 5 s, 10°C), supernatant opět odsát, pelet

resuspendován v 0,1 ml 0,1 M CaCl_2 a po přidání 0,025 ml 45% (w/v) glycerolu byla směs okamžitě zamrzána a uchovávána v -70°C .

5.8 Maloobjemové kultivace

Všechny kultivace v Petriho miskách v 37°C probíhaly v thermoboxu Biological thermostat BT – 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR). Buňky byly sterilně zaočkovány na předpřipravené sterilní misky s pevným LB médiem a případně i s antibiotikem (vždy 100 μl zásobního roztoku na 100 ml media) a ponechány kultivovat dnem vzhůru.

Kultivace v tekutém mediu probíhaly ve třepačce Orbital Incubator Illuminated Cooled Gallenkamp (Fistreem International Ltd., Velká Británie), pokud bylo potřeba udržovat 37°C .

V případě, kdy buňky rostly ve 28°C , byly baňky, popř. misky, umístěny do komorového boxu s udržovanou teplotou.

5.8.1 Příprava glycerinové konzervy

0,6 ml buněčné kultury narostlé v tekutém LB mediu s kanamycinem, která byla kultivovaná 18 hodin v 28°C , bylo opatrně promícháno s 600 μl roztoku Tris/glycerol a okamžitě zmrazeno na -80°C .

Roztok Tris/glycerol: 65% (v/v) glycerol, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Sterilizace 30 minut v 121°C .

5.9 Kultivace v laboratorním míchaném bioreaktoru

5.9.1 Příprava inokula

Pro kultivaci v bioreaktoru byla použita dvoustupňová inokulace. Produkční kmen *E. coli* BL21(DE3)JM5 z pracovní glycerinové konzervy byl zaočkován na Petriho misku s LB médiem doplněným kanamycinem a inkubován při 28°C po dobu 16 hodin. Inokulum 1. generace bylo připraveno přenesením monokolonie sterilní kličkou z Petriho misky do 100 ml tekutého LB media doplněného kanamycinem. Baňky byly kultivovány za stálého míchání (3,33 Hz) na rotační třepačce při teplotě 28°C po dobu 6,5 hodin. Narostlou kulturou (2 ml) byly zaočkovány 500ml baňky obsahující 100 ml produkčního media MYEGly a inkubovány při 28°C po dobu 18,5 hodin. Tímto bylo připraveno inokulum 2. generace, které bylo použito pro zaočkování bioreaktoru.

5.9.2 Kultivace v míchaném bioreaktoru

Produkční kmen *E. coli* BL21(DE3)JM5 byl kultivován v 10 litrech míchaném laboratorním bioreaktoru (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Německo), který byl naplněn produkčním médiem MYEGly v pracovním objemu 6 litrů. Bioreaktor byl sterilizován 90 minut při teplotě 121°C. Po sterilizaci byly do produkčního media přidány sterilně jednotlivé stopové prvky ze zásobních roztoků v množství 100 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 50 ml $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Vlastní kultivace probíhala ve dvou fázích: jednorázová a přítokovaná kultivace. V průběhu jednorázové kultivace byla pomocí automatického zvyšování frekvence míchání udržována koncentrace rozpuštěného kyslíku na 20 rel% hodnoty saturace media kyslíkem. Rychlost míchání se pohybovala v rozmezí 5 – 15 Hz. Fáze přítokované kultivace probíhala při fixní hodnotě otáček míchadla 13,33 Hz a pro přidání zdroje uhlíku (40% (w/v) glycerol) byla zvolena strategie přítoku živin podle spotřeby kyslíku kulturou (DO-stat), tj. hodnota pO_2 byla udržována v okolí hodnoty 20 rel%. Počáteční teplota (28°C) a vzdušnění (6 l/min) byly udržovány po celou dobu kultivace. Hodnota pH media na počátku kultivace byla 7,0 a na této hodnotě byla udržována pomocí 25% (w/v) NH_4OH po celou dobu kultivace.

V průběhu přítokované kultivace byla provedena indukce 10% roztokem laktózy ve dvou dávkách. První dávka byla provedena v 19. hodině kultivace v množství 170 g a druhá dávka po 24,5 hodinách kultivace v množství 75 g zásobního roztoku laktózy.

V průběhu celé kultivace byly odebírány vzorky kultury pro stanovení růstových a produkčních parametrů: optické density (OD_{600}), suché hmotnosti buněk (cdw), zbytkové koncentrace laktózy, volumetrické hydrolytické aktivity proteinu (VA^{H}) a specifické hydrolytické aktivity proteinu (SA^{H}).

5.9.3 Příprava vzorků pro stanovení hydrolytické aktivity proteinu

Buňky ze 4 ml buněčné kultury odebrané v průběhu kultivace v bioreaktoru byly odděleny od media centrifugací (5 minut, 15 000xg) na přístroji Universal 16R Centrifuge (Hettich Lab Technology, Německo). Supernatant byl odstraněn, buňky resuspendovány v 4 ml 0,1 M fosfátovém pufru pH 7 a opětovně odděleny od pufru centrifugací (5 minut, 15 000xg, Universal 16R Centrifuge (Hettich Lab Technology, Německo). Pelet byl uschován v -20°C po

dobu minimálně jedné hodiny, poté byly buňky opět resuspendovány ve 4 ml fosfátového pufru a byl připraven bezbuněčný extrakt podle postupu v kapitole 5.10.1.

5.9.4 Příprava vzorků pro suché hmotnosti buněk a její stanovení

Pro stanovení suché hmotnosti buněk byly buňky z 1ml kultury sedimentovány na centrifuze (5 minut, 15 000xg, Eppendorf centrifuge 5403, Německo) a promyty 1 ml destilované vody. Po další centrifugaci (5 minut, 15 000xg, Eppendorf centrifuge 5403, Německo) byly buňky uschovány v -20°C nebo resuspendovány v 1 ml destilované vody a použity rovnou na stanovení suché hmotnosti buněk.

Stanovení bylo provedeno přenesením 1 ml buněčné suspenze do připravené mističky se známou hmotností a sušení probíhalo minimálně 4 hodiny v KBC – 25W Automatic (Wamed, Polsko).

5.9.5 Stanovení koncentrace zbytkové laktosy v mediu

Při přípravě vzorků pro stanovení suché hmotnosti buněk byl supernatant, který vznikl při prvním stáčení buněčné kultury odebrán a v něm následně stanovena zbytková koncentrace laktosy. Byl smíchán 1 ml supernatantu a 1 ml DNS roztoku, směs byla 5 minut inkubována v lázni s vroucí vodou, následně bylo přidáno 10 ml destilované vody a směs zchlazena ve studené lázni. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 540 nm na spektrofotometru HALO DB – 20 UV-VIS Double Beam Spectrophotometer (Dynamica, Velká Británie).

Kalibrační křivka pro roztok DNS byla vytvořena změřením absorbancí roztoků se známou koncentrací laktosy, výsledky byly zaneseny do grafu a ze směrnice příslušné regresní přímky, byl stanoven faktor DNS roztoku.

Koncentrace laktosy byla stanovena výpočtem podle vzorečku:

$$c_{lac} \text{ (mg/ml)} = (A_{540} / f) * \text{ředění}$$

kde: f je směrnice kalibrační přímky pro roztok DNS

A₅₄₀ je naměřená absorbance

Roztok DNS: 0,01% (w/v) kyselina 3,5-dinitrosalicylová, 0,3% /w/v) vinan sodnodraselný, 0,4 M NaOH

5.10 Izolace nativního enzymu

Nativní enzym byl izolován z 44,05 g vlhké hmotnosti buněčné pasty, která byla rozpuštěná v 180 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0.

V průběhu celého postupu izolace a následné purifikace byl roztok udržován v ledové lázni a v jednotlivých krocích byly odebírány vzorky pro pozdější stanovení specifické, volumetrické hydrolytické aktivity na ampicilin a koncentrace proteinů, vždy byl odebrán 1 ml do mikrozkuřavky a okamžitě uschován v -20°C.

5.10.1 Sonikace

Resuspendované buňky s maximální optickou denzitou OD_{600} 10, byly rozbíjeny sonikací na sonikátoru Microsonix XL 2000 (Misonix, USA). Sonikace byla prováděna opakovaně čtyřicetkrát a probíhala vždy po dobu 20 vteřin s intervaly pro ochlazení také 20 vteřin. Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací: 71 552xg, 20 min, 4°C v Eppendorf centrifuge 5403 (Eppendorf, Německo). Supernatant (bezbuněčný extrakt) byl ihned použit k dalším experimentům.

5.10.2 Frakční srážení síranem amonným

Do bezbuněčného extraktu byl přidáván síran amonný tak, aby došlo k vysrážení co největšího množství AEH, ale zároveň ne příliš velké množství jiných proteinů. Míra nasycení supernatantu byla empiricky stanovena pro konkrétní expresní systém a rekombinantní protein. Hmotnost síranu amonného pro danou saturaci roztoku proteinů byla stanovena na základě výpočtu na volně přístupných internetových stránkách Ammonium sulfate calculator (www.Encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm). Pro 70% saturaci síranem amonným bylo přidáno 100 g $(NH_4)_2SO_4$ do 152 ml bezbuněčného extraktu.

Síran amonný byl přidáván k cell-free extraktu pomalu po dobu dvou hodin za stálého míchání a chlazení v ledové lázni. Po 2 hodinách míchání byla směs v klidu uchovávána ve 4°C přes noc pro optimální precipitaci. Precipitát byl oddělen od supernatantu centrifugací 17 888xg, 15 min, 4°C v Sorval RC6+ Centrifuge (Thermo Scientific, USA). Supernatant byl z centrifugační kyvety odstraněn a pelet uschován v -20°C.

Pro další experimenty byl síranový precipitát rozpuštěn ve 20 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,0 a roztok dialyzován.

5.10.3 Dialýza

Roztok byl převeden do předpřipraveného dialyzačního střívka a uzavřen. Střívko bylo poté umístěno do kádinky s 0,01 M fosfátovým pufrem pH 7 a za stálého míchání byl roztok proteinů dialyzován ve 4°C přes noc. Pro dialýzu přes noc by měl být objem dialyzačního pufru k objemu dialyzovaného vzorku v poměru asi 1 : 250.

5.10.3.1 Příprava dialyzačních střívek

Dialyzační střívka byla před použitím předpřipravena. Střívka o vhodné délce byla v roztoku 2% NaHCO₃ s 1 mM EDTA vařena 10 min, následně dvakrát promyta deionizovanou vodou s 1mM EDTA a poté byla v 1mM EDTA opět vařena po dobu 10 minut. Střívka byla skladována ve 4°C v roztoku 20% ethanolu a před použitím byla omyta deionizovanou H₂O.

5.11 Purifikace enzymu

5.11.1 Chromatografie na koloně s náplní fractogel COO⁻

Chromatografie probíhala v koloně (100 x 16 mm, Merck, Německo), kde pevnou fází tvořil fractogel EMD 6500 (S) (20 x 2,5 cm).

Vzorek po dialýze byl před nanesením na kolonu stočen na centrifuze Eppendorf centrifuge 5403 (Eppendorf, Německo) při 23 000xg, 5 minut, 4°C, aby neobsahoval žádné pevné částice. Supernatant byl pomocí pumpy P580 Pump a ASI-100 automated sample injector (Thermo Scientific, USA) převeden na kolonu, poté byl systém promyt 60 ml pufru „A“ a enzym byl uvolňován směsí mobilních fází „A“ a „B“ se zvyšující se koncentrací solí. Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min a frakce byly jímány po 2,5 minutách.

V eluovaném roztoku byla měřena absorbance při 280 a 260 nm a data byla v reálném čase zpracovávána programem Chromeleon (Thermo Scientific, USA). Frakce byly krátkodobě skladovány ve 4°C.

Mobilní fáze „A“: 0,01 M fosfátový pufr pH 7,0

Mobilní fáze „B“: 0,01 M fosfátový pufr s 0,2 M NaCl, pH 7,0

5.11.2 Gelová filtrace

Gelová filtrace probíhala v koloně, která byla naplněna pevnou fází Superdex 200 (75 cm x 1,6 cm) a ekvilibrována mobilní fází „C“. Před nanášením na kolonu byl vzorek centrifugován v Eppendorf centrifuge 5403 (Eppendorf, Německo) při 23 000xg, 5 minut, 4°C, abychom se vyhnuli nanesení pevných částic na kolonu. Eluce byla provedena mobilní fází „C“, průtok na 1 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány po 5 min a krátkodobě skladovány ve 4°C. Na základě chromatografu byly vybrané frakce s purifikovaným AEH opět spojeny. Purifikovaný enzym byl použit pro stanovení jeho vlastností, přičemž byl neustále uchováván ve 4°C nebo v ledové lázni po dobu maximálně 12 hodin. Enzym, který nebyl okamžitě zpracován, byl zamražen na -70°C.

Gelová filtrace byla provedena dvakrát, jednou pro každý ze spojených vzorků po afinitní chromatografii, přičemž postup byl v obou případech stejný.

Mobilní fáze „C“: 0,05 M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,15 M NaCl

5.12 Stanovení koncentrace proteinů

V odebíraných vzorcích z purifikace enzymu byla stanovena koncentrace proteinů chromogenní reakcí pomocí komerčně dostupného kitu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Life Technologies, USA). Byl dodržen doporučený postup. Detekce chromogenní reakce byla provedena na spektrofotometru HALO DB – 20 UV-VIS Double Beam Spectrophotometer (Dynamica, Velká Británie).

5.13 Stanovení specifické hydrolytické aktivity AEH na ampicilin

Byla prováděna hydrolytická reakce katalyzovaná AEH, při které je štěpen ampicilin. Produkt reakce (6-APA) následně reaguje s DAB a vzniku Schiffovy báze, jejíž koncentraci lze stanovit spektrofotometricky (Balasingham et al. 1972).

Pro stanovení byla použita buněčná kultura, bezbuněčný extrakt nebo vzorky odebrané v průběhu izolace a purifikace enzymu s různým ředěním.

Připravená reakční směs byla temperována ve vodní lázni o teplotě 30°C a reakce byla spuštěna přidáním 1 ml buněk produkujících AEH nebo 50 µl vzorku s AEH. Z reakční směsi byl po 5 minutách odebírán vzorek (0,5 ml), který byl okamžitě smíchán ve zkumavce se STOP směsí pro zastavení enzymatické reakce. Tak byly vytvořeny 4 vzorky (odebrány po 5, 10, 15, 20

minutách), ve kterých byly následně odstraněny pevné částice centrifugací 12 000xg, 3 minuty na centrifuze Universal 16R Centrifuge (Hettich Lab Technology, Německo), aby nedocházelo ke zkreslení výsledků při stanovení na spektrofotometru. Po stočení byl do směsi přidán DAB a po 15 minutách při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při 415 nm na spektrofotometru HALO DB – 20 UV-VIS Double Beam Spectrophotometer (Dynamica, Velká Británie). Pro všechna stanovení hydrolytické aktivity platí, že enzymatická reakce byla prováděna ve třech nezávislých měřeních. Aktivita byla vypočtena pro jednotlivá měření zvlášť a uváděná data jsou aritmetickým průměrem získaných dat.

Reakční směs I – pro stanovení hydrolytické aktivity:

Enzym (v buňkách, nebo čistý)	1 nebo 0,05 ml
Ampicilin 1% (w/v)	1 ml

Doplněno 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7 na celkem 3 ml.

Reakční směs II – pro kolorimetrickou reakci:

Vzorek reakční směsi I	0,5 ml
STOP směs	3 ml
DAB	0,5 ml

5.13.1 Výpočet hydrolytické aktivity AEH pro hydrolýzu ampicilinu

Z dat ze spektrometru byl vytvořen graf závislosti absorbance na retenčním času. Směrnice (f) této přímky byla poté použita ve výpočtu.

Faktor DAB ($f_{DAB} = 7,3909$) byl vypočten z kalibrační křivky. Byly připraveny směsi s různými koncentracemi 6-APA (roztok 0,1 M fosfátového pufru pH 7 s 6-APA o známé koncentraci, STOP směs a DAB) u nichž byla změřena absorbance při 415 nm. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti absorbance na koncentraci 6-APA, čímž vznikla kalibrační křivka. Volumetrická a specifická hydrolytická aktivita (počet jednotek v jednom litru příslušného roztoku) byla vypočítána na základě vzorečku:

$$VA^H (U/ml) = f * 7,3909 * 60$$

kde: f je směrnice přímky grafu, který vznikl vynesemím závislosti absorbance na retenčním času

7,3909 je faktor DAB

60 je ředění ve 3 ml reakční směsi I

Pokud by byl vzorek před nanesením do reakční směsi I ještě ředěn, je nezbytné ředění zahrnout do rovnice.

$$SA^H \text{ (U/mg)} = VA \text{ (U/ml)} / \text{koncentrace proteinů (mg/ml)}$$

Měření koncentrace proteinů viz kapitola 5.12.

5.14 Substrátová specifita hydrolytické reakce AMP

Stanovení bylo totožné jako stanovení specifické hydrolytické aktivity AEH na ampicilin (viz. 2.13.1). Do reakční směsi byl místo ampicilinu přidán 1% roztok jiného potenciálního substrátu: cefalexin a penicilin G.

5.15 Teplotní stabilita a teplotní optimum AEH pro hydrolýzu ampicilinu

Podmínky stanovení byly shodné se stanovením hydrolytické aktivity AEH na ampicilin (viz. 2.13.1), ale reakce probíhala v jiných teplotách. Pro stanovení teplotního optima byla hydrolytická reakce provedena v teplotách 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C a 55°C. Teplotní stabilita byla zjišťována tak, že byl enzym před přidáním do reakční směsi inkubován 30 minut v dané teplotě (4°C, 20°C, 30°C, 37°C a 40°C).

5.16 pH optimum AEH

Uspořádání reakce bylo opět stejné (viz. 2.13.1), ale do reakce byly použity pufrы o různém pH. Byly vybrány 3 různé druhy pufrů, aby bylo možné otestovat širokou škálu pH. Použity byly pufr Tris, fosfátový a citrátový s uvedenými pH.

Tris: A = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (24,2 g), B = HCl (0,2 M roztok)

+ doplnit dH₂O na 100 ml

pH	Roztok A (ml)	Roztok B (ml)
8,0	50	26,8
8,4	50	16,5
9,0	50	5,0

Výsledný roztok je 0,1 M, pH bylo upraveno pomocí NaOH.

Fosfátový pufr: A = Na₂HPO₄*12H₂O (71,46 g), B = NaH₂PO₄.2H₂O (31,21 g)

Oba roztoky byly doplněny dH₂O do 1 litru.

pH	Roztok A (ml)	Roztok B (ml)
6,4	13,25	36,75
7,0	30,5	19,5
7,4	40,5	9,5

Takto vznikl 0,1 M pufr, pH bylo překontrolováno a upraveno pomocí NaOH.

Citrátový pufr: A = kyselina citrónová (21,01 g), B = citronan sodný – C₆H₅O₇Na₃·2H₂O (29,41 g)

Oba roztoky byly doplněny dH₂O do 1 litru.

pH	Roztok A (ml)	Roztok B (ml)
3,0	46,5	3,5
3,4	40,0	10,0
4,0	33,0	17,0
4,4	28,0	22,0
5,0	20,5	29,5
5,4	16,0	34,0
6,0	9,5	41,5

Vznikl 0,1 M pufr, pH upraveno pomocí NaOH.

6. Výsledky

6.1 Primery pro amplifikaci *aeH_{Asp}* PCR reakcí

Amplifikace strukturního genu *aeH_{Asp}* byla provedena pomocí metody PCR, kdy byl použit jako templát rekombinantní plasmid pKAMP, který byl připraven v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AV ČR v.v.i. v rámci hledání nových penicilin-G-acylas a nesl přibližně 9 kbp fragment chromosomální DNA penicilin-G-acylasa-pozitivního organismu *Achromobacter* sp. CCM 4824.

Za použití dříve získaných částečných informací o aminokyselinové sekvenci fragmentů proteinu AEH_{Asp}, „produkovaných“ z pKAMP, byla navržena sada degenerovaných primerů pro potenciální amplifikaci větší části genu (Tab. 3). Degenerované primery byly odvozeny z proteinových sekvencí AEH_{Asp}, odpovídajících konvenčním homologním oblastem sekvencí proteinů z organismů *Xylella fastidiosa* (WP_010893548 a WP_004089355), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (WP_011051520) a *Acetobacter turbidans* (AAL60195) a to tak, aby byly částečně komplementární k nukleotidové sekvenci kódující tyto známé úseky proteinové sekvence.

Tab. 3: Degenerované primery navržené na základě známé aminokyselinové sekvence fragmentů AEH_{Asp}.

Název primeru	Forward/reverse	Délka (nt)	Oblast proteinu
FwdProt1	F	23	NAPILLTR
FwdProt2	F	26	PQGDEVF
FwdProt3	F	23	GKYGS
FwdProt4	F	26	PHPALK
RevProt5	R	27	LVMGPW
RevProt6	R	24	TALQFR
RevProt7	R	27	LIYNTG
RevProt8	R	26	FPLYDR

Ačkoliv bylo pomocí PCR reakcí syntetizováno velké množství různě dlouhých fragmentů DNA, nepodařilo se získat žádné *aeH*-specifické amplikony a to ani při použití výše uvedených degenerovaných primerů v kombinaci s původními primery UpAcet2, RevAcet1, Upkons1, Upkons2, Revkons1 a Revkons2, pomocí nichž byl amplifikován přibližně 500 nt

fragment (popř. jeho 300 nt „vnitřní oblast) strukturního genu *aeH_{Asp}* na DNA templátu pKAMP či chromosomální DNA *Achromobacter* (výsledky nejsou uvedeny).

Proto byla navržena, a to na základě sekvence *aeH* ze *Stenotrophomonas maltophilia*, která vykazovala nejvyšší stupeň homologie s osekvenovaným 500 nt fragmentem *aeH_{Asp}* získaným při dřívějších amplifikačních experimentech s plasmidem pKAMP jakožto DNA templátem, nová sada primerů (Tab. 4). Po optimalizaci PCR reakce s těmito oligonukleotidy byl pomocí kombinace primerů FWDSTEN_Nde2 + REVSTEN_STOPXba2, již fragment DNA o odpovídající velikosti cca 2 000 nt amplifikován a následně použit v dalších experimentech (Obr. 9).

Tab. 4: Specifické primery navržené na základě *aeH* kmene *Stenotrophomonas maltophilia* s restrikčními místy pro restrikční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*.

Název primeru	Forward/reverse	Délka (nt)	Rozeznávaná oblast
FwdSTEN_Nde2	F	41	- 9 – 32
FwdSTEN_ATGless2	F	29	1 – 29
RevSTEN_EcoRI2	R	32	1886 – 1918
RevSTEN_STOPXba2	R	32	1886 – 1918

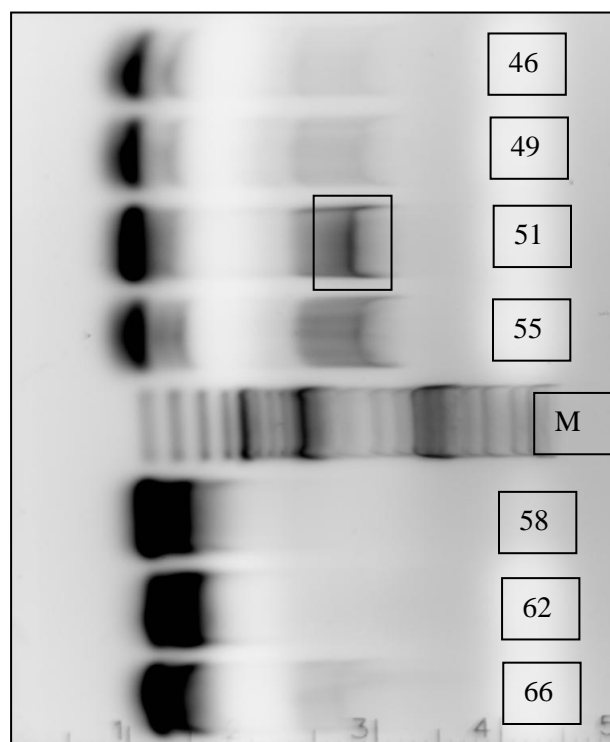
6.2 Optimalizace PCR reakce

DNA templátem pro PCR reakci byl izolovaný rekombinantní plasmid pKAMP, purifikovaný komerčně dostupným kitem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo). PCR reakce byla optimalizována pro amplifikaci specifického produktu o velikosti přibližně 2 000 nt, který by mohl nést celý strukturní gen *aeH_{Asp}* a to z hlediska teploty nasedání primerů a použité DNA polymerasy. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs Inc.) s aditivem GC enhancer (10 µl), které je součástí komerčně dodávaného balení Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Testované DNA polymerasy použité při optimalizaci PCR reakce uvádí tabulka 4.

Tab. 4: Použité DNA polymerasy a jejich specifita vzhledem k amplifikaci *ae_hAsp*.

Polymerasa	Výrobce	Specifita
GoTaq® DNA Polymerase	Promega, USA	-
Maxima™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Life technologies, USA	-
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Agient Technologies, USA	- +
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs Inc., Velká Británie	+

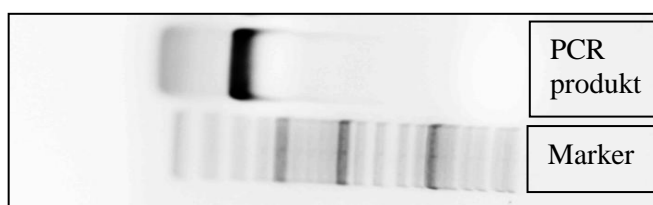
Pro stanovení optimální teploty pro nasedání primerů byla připravena gradientová PCR s rozmezím teplot 46 – 66°C pro všechny výše uvedené DNA polymerasy, přičemž PCR produkt o očekávané velikosti vznikl téměř výhradně při teplotě 51°C (Obr. 9).



Obr. 9: Elektroforetogram gradientové PCR pro amplifikaci *ae_hAsp* pomocí kombinace primerů FWDSTEN_Nde2 + REVSTEN_STOPXba2 a Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Jednotlivá čísla u nanesených vzorků jsou teploty nasedání primerů, přičemž v dráze „51“ je vyznačen požadovaný PCR produkt. Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

6.3 Subklonování strukturního genu *ae_h_{Asp}*

Získaný produkt PCR reakce o velikosti cca 2 000 bp byl vyříznut a extrahován z gelu dle protokolu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko). Purifikovaný PCR amplikon byl pro primární ověření své specifčnosti použit jako templátová DNA pro Nested PCR reakce s vnitřními specifickými primery Upkons2 a Revkons1, které byly navrženy specificky z 500nt fragmentu *ae_h_{Asp}*. Jelikož při PCR reakcích došlo ke specifické amplifikaci produktu odpovídající délky (cca 300 nt, Obr. 10), dalo se předpokládat, že purifikovaný PCR produkt o velikosti 2 kbp by mohl nést celý strukturní gen *ae_h_{Asp}*.



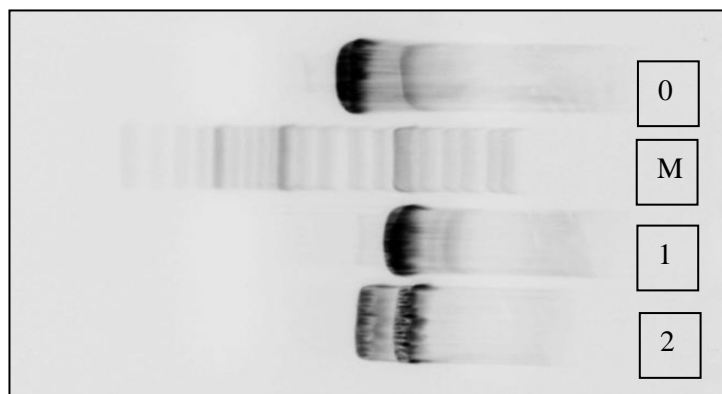
Obr. 10: Nested PCR s 300nt fragmentem *ae_h* genu. Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Pro definitivní potvrzení tohoto předpokladu byla nutno PCR amplikon nejdříve subklonovat a poté podrobit sekvenční analýze. Po adenylaci svých 3'konců byl PCR produkt ligován do vektoru pGEM-T_{Easy}™ (Promega, USA). Ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* TOP10 a vyšetá suspenze byla přes noc kultivována na pevném LB mediu s ampicilinem v teplotě 37°C.

Mezi koloniemi narostlými po transformaci byly identifikovány metodou Colony PCR ty, které měly rekombinantní plasmid s vloženým celým amplikonem. K identifikaci byly použity univerzální primery (M13/pUC sekvenační primer a M13/pUC reverzní sekvenační primer), které jsou komplementární k sekvencím, které obklopují mnohočetné klonovací místo ve vektoru pGEM-T_{Easy}™. Petriho misky s přenesenými koloniemi byly po kultivaci obaleny parafilmem a uschovány ve 4°C.

Kolonie nesoucí velikostně odpovídající inserty byly použity pro minipreparaci rekombinantních plasmidů metodou alkalické denaturace. Izolované plasmidy byly pro kontrolu následně štěpeny restrikčními endonukleasami *Nde*I a *Eco*RI - HF® v reakčním pufru CutSmart® Buffer tak, aby byl vložený insert (*ae_h_{Asp}*) oddělen vektoru. Na základě velikosti insertu na elektroforetogramu (výsledky nejsou uvedeny) byl vybrán jeden rekombinantní plasmid, který

byl označen jako pGAsp a po purifikaci byl nanesen na agarosový gel ve štěpené i neštěpené formě (Obr. 11) a byl odeslán k osekvenování.



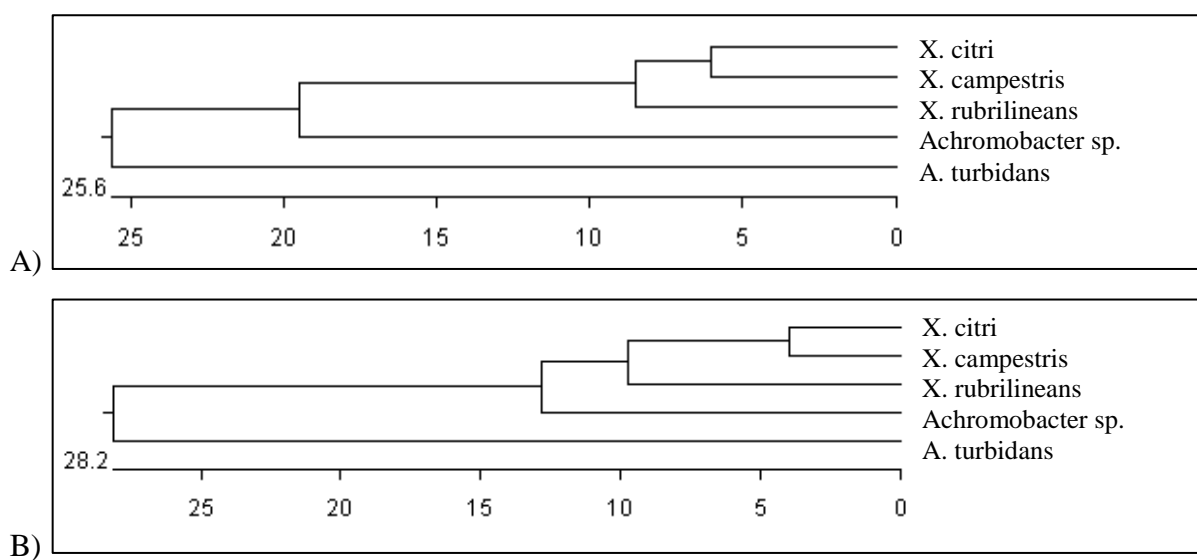
Obr. 11: Elektroforetogram plasmidu pGAsp. 0 – standard cirkulární formy DNA velikosti 3 kbp, 1 – izolovaný plasmid pGAsp, 2 – linearizovaný plasmid pGAsp a uvolněný insert. Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

6.4 Analýza sekvence *aeH_{Asp}* a peptidu AEH_{Asp}

Ze získané sekvence rekombinantního plasmidu pGAsp bylo zjištěno, že náš strukturní gen obsahuje 1 914 nukleotidů (včetně stop kodonu). Na základě nukleotidové sekvence *aeH_{Asp}* byla v programu EditSeq (DNASTAR) určena aminokyselinová sekvence polypeptidu, která byla dále analyzována. Na základě nástroje pro předpovídání signálních sekvencí (Petersen et al. 2011) byla identifikována N-terminální signální sekvence lokalizovaná od 1. do 22. aminokyseliny. Nativní protein je tvořen 615 aminokyselinami s molekulární hmotností 69 kDa. Pomocí výše uvedeného programu EditSeq byl vypočten i teoretický izoelektrický bod proteinu činící 6,12.

Předpokládaná sekvence proteinu byla také porovnána v databázi BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sekvence vykazuje vysokou homologii (99 %) s enzymem glutaryl-7-ACA-acylasa izolovaným z organismu *Stenotrophomonas maltophilia* a nižší homologie (76 – 79 %) s enzymy AEH izolovanými z různých kmenů rodu *Xanthomonas*.

Nukleotidová i aminokyselinová sekvence *aeH_{Asp}* byla porovnána v programu MegAlign (DNASTAR) se zveřejněnými sekvencemi pro AEH z organismů *Acetobacter turbidans*, *Xanthomonas citri*, *X. rubrilineans* a *X. campestris* (Obr. 12 a 13, tab. 5). Tyto analýzy potvrdily, že amplifikovaný gen s vysokou pravděpodobností kóduje esterasu α -aminokyselin.

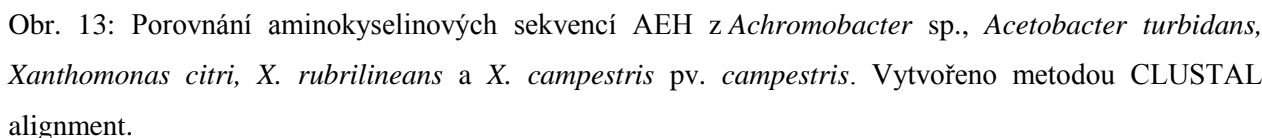


Obr. 12: Fylogenetický strom sestrojený metodou CLUSTAL alignment ze známých sekvencí AEH z *Acetobacter turbidans*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. citri* a *X. rubrilineans* a získané sekvence z *Achromobacter* sp. Délka linie znázorňuje evoluční vzdálenost. K sestavení byly použity: A) nukleotidové sekvence, B) proteinové sekvence.

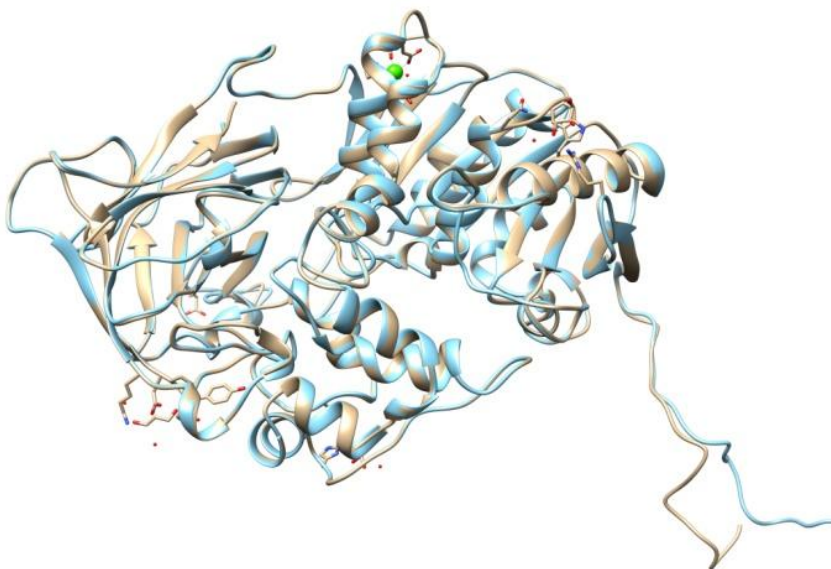
A)		Shoda (%)				
		<i>Achromobacter</i> sp.	<i>A. turbidans</i>	<i>X. citri</i>	<i>X. rubrilineans</i>	<i>X. campestris</i>
Divergence	<i>Achromobacter</i>		55,2	66,0	66,1	66,3
	<i>A. turbidans</i>	52,8		55,3	55,5	55,0
	<i>X. citri</i>	38,3	49,6		82,1	88,1
	<i>X. rubrilineans</i>	40,1	48,2	17,2		82,3
	<i>X. campestris</i>	38,8	51,8	12,1	16,7	

B)		Shoda (%)				
		<i>Achromobacter</i> sp.	<i>A. turbidans</i>	<i>X. citri</i>	<i>X. rubrilineans</i>	<i>X. campestris</i>
Divergence	<i>Achromobacter</i>		57,8	76,5	78,4	76,5
	<i>A. turbidans</i>	55,7		57,3	58,0	57,6
	<i>X. citri</i>	27,4	58,0		82,1	92,5
	<i>X. rubrilineans</i>	24,0	56,2	19,9		82,7
	<i>X. campestris</i>	26,9	57,7	8,0	19,1	

Tab. 5: Příbuznost sekvencí různých AEH z různých zdrojů určená metodou CLUSTAL alignment. A) nukleotidové sekvence, B) proteinové sekvence.



Z aminokyselinové sekvence byl vytvořen pomocí programu Modeller (Andrej Sali, USA) model terciární struktury nativního enzymu AEH_{Asp} (Obr. 14) a to na základě modelu struktury AEH z *Xanthomonas citri*. Na modelu je možné rozeznat jednotlivé strukturní domény.



Obr. 14: 3D model jedné podjednotky AEH z *Achromobacter* (modrý), podle struktury AEH *Xanthomonas citri* (béžový), vytvořeno v programu Modeller. Strukturní domény: vlevo C-terminální („jelly-roll“ struktura), uprostřed v dolní části „cap“ doména, vpravo N-terminální doména („ α/β hydrolase fold“) s N-terminálním raménkem (struktura vpravo v prostoru).

6.5 Příprava expresního systému pro AEH_{Asp} v *E. coli* BL21(DE3)

Restrikcí rekombinantního plasmidu pGAsp enzymy *Nde*I a *Eco*RI - HF[®] byl po izolaci z gelu získán klonovaný insert nesoucí celý strukturní gen *aeH_{Asp}*, který byl po purifikaci z agarosového gelu vložen do expresního vektoru pET-26b (+). Před použitím do ligační směsi byla vektorová molekula rovněž simultánně štěpena restriktasami *Nde*I a *Eco*RI - HF[®] a takto získaný „lineární“ vektor byl přečištěn pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko). Polovinou ligační směsi (15 μ l) byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* TOP10 a kultura transformantů byla kultivována na pevném LB médiu s kanamycinem při teplotě 37°C po dobu 16 hodin.

Pomocí Colony PCR se sadou primerů Fwd primer T7 a Rev primer T7 terminator byly vybrány ty kolonie, které nesly plasmid s insertovaným celý strukturním genem. Několik rekombinantních plasmidů bylo izolováno a velikostně ověřeno štěpením kombinací restrikčních endonukleas *NdeI* a *EcoRI* - HF[®].

Vybraný plasmid s insertem o pravděpodobné velikosti celého strukturního genu *aeH_{Asp}* (pEAsp) byl purifikován pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Švýcarsko) a byl jím transformován hostitelský kmen *E. coli* BL21(DE3). Pro identifikaci kolonií, které nesou rekombinantní plasmid, byla opět provedena Colony PCR s použitím sady Fwd primer T7 a Rev primer T7 terminator.

Po výsevu odpovídajících transformantů na pevnou půdu bylo vybráno 15 kolonií pro stanovení hydrolytické aktivity AEH na ampicilin. Kolonie byly kultivovány v 10 ml tekutého LB média s kanamycinem a 40 µl laktosy jako induktorem po dobu 16 hodin při teplotě 28°C na rotační třepačce (3,3 Hz). Vzorke narostlých kultur byly následně zpracovány pro stanovení hydrolytické aktivity AEH podle postupu uvedeného v kapitole 5.13. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Hydrolytické aktivity jednotlivých klonů expresního systému *Escherichia coli* BL21(DE3) s pEAsp.

Klon <i>E. coli</i> BL21 (DE3) s pET 26b(AEH)	Volumetrická aktivita (U/litr)	Specifická aktivita (U/mg proteinu)
1	1377	918
2	1437	958
3	1465	1047
4	1657	1105
5	1672	1114
6	1808	1206
7	1657	1104
8	1458	972
9	2075	1383
10	2067	1378
11	2094	1396
12	2084	1389
13	1938	1292
14	1916	1278
15	2046	1364

Klon číslo 11 s nejvyšší specifickou aktivitou byl označen jako *E. coli* BL21(DE3)JM5. Rekombinantní plasmid byl z tohoto klonu izolován a ověřen sekvenací.

6.6 Kultivace *E. coli* BL21(DE3)JM5 v míchaném bioreaktoru

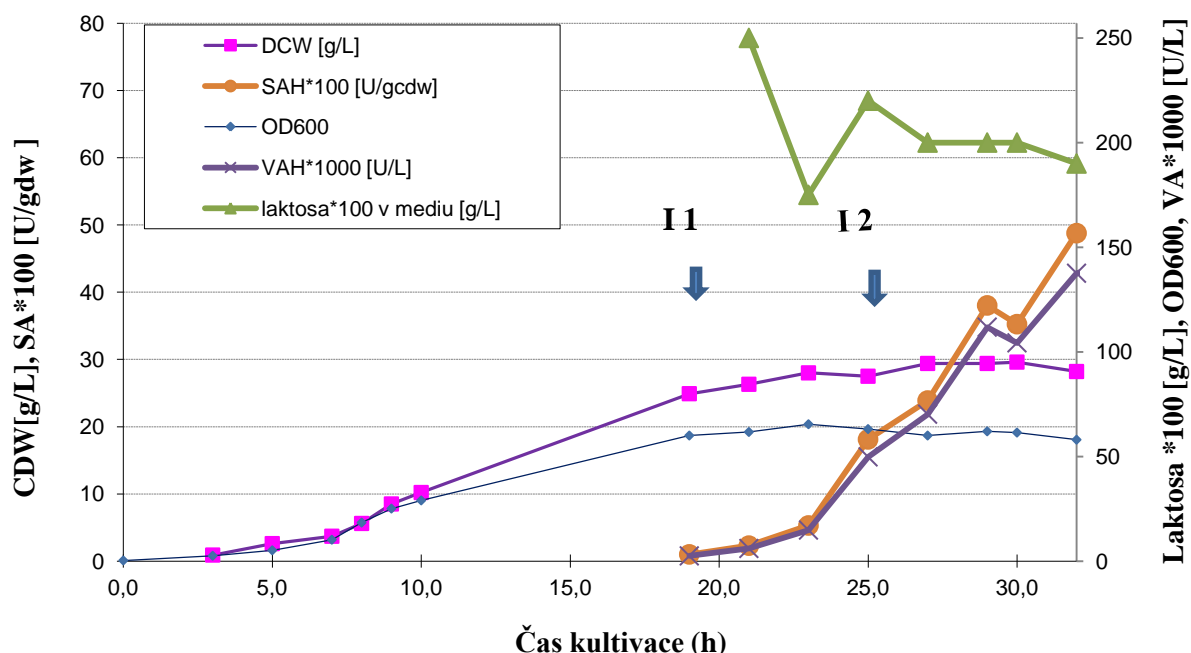
Bakteriální kmen *Escherichia coli* BL21(DE3)JM5 byl kultivován na minerálním médiu doplněném kvasničným autolyzátem a glycerolem jako zdrojem uhlíku a energie dle postupu uvedeného v kapitole 5.9. Cílem kultivace bylo získat maximální množství biomasy, z které byl následně purifikován rekombinantní enzym AEH.

Inokulace fermentoru probíhala dvoustupňově. Nejprve bylo připraveno inokulum 1. generace, které po 6,5 hodinách kultivace dosáhlo následujících parametrů: optická densita kultury OD_{600} 3,39, pH 7,0. Z této kultury bylo vytvořeno inokulum 2. generace s těmito parametry: optická densita OD_{600} 8,66 a pH 5,07.

Fáze jednorázové kultivace na mediu MYEGly v bioreaktoru trvala 9 hodin a poté byla zahájena fáze přítokované kultivace za konstantního míchání (13,33 Hz) a průběžného přítoku 40% roztoku glycerolu jako zdroje uhlíku. Indukce syntézy AEH byla provedena jednorázově přidáním 10% roztoku laktosy ve dvou dávkách induktoru: 1. dávka (170 g zásobního roztoku laktosy) byla použita v 19. hodině kultivace, kdy OD_{600} kultury dosáhla hodnoty 60 a druhá dávka (75 g zásobního roztoku) byla aplikována po 24,5 hodinách kultivace (OD_{600} byla přibližně 63). Fermentace byla ukončena po 36 hodinách.

V průběhu kultivace byly odebírány vzorky a stanoveny růstové a produkční parametry: suchá hmotnost buněk (DCW), specifická (SA^H) a volumetrická (VA^H) aktivita AEH, optická densita (OD_{600}) a zbytková koncentrace laktosy v mediu (Obr. 15).

Po ukončení kultivace za výše popsáných podmínek byla suchá hmotnost buněk 27,6 g/l, při optické densitě OD_{600} 56. Zároveň byl připraven bezbuněčný extrakt pomocí sonikace (kapitola 5.10.1) a byla stanovena $SA^H = 6\,084\text{ U/g}_{cdw}$ a $VA^H = 167\,930\text{ U/l}$.

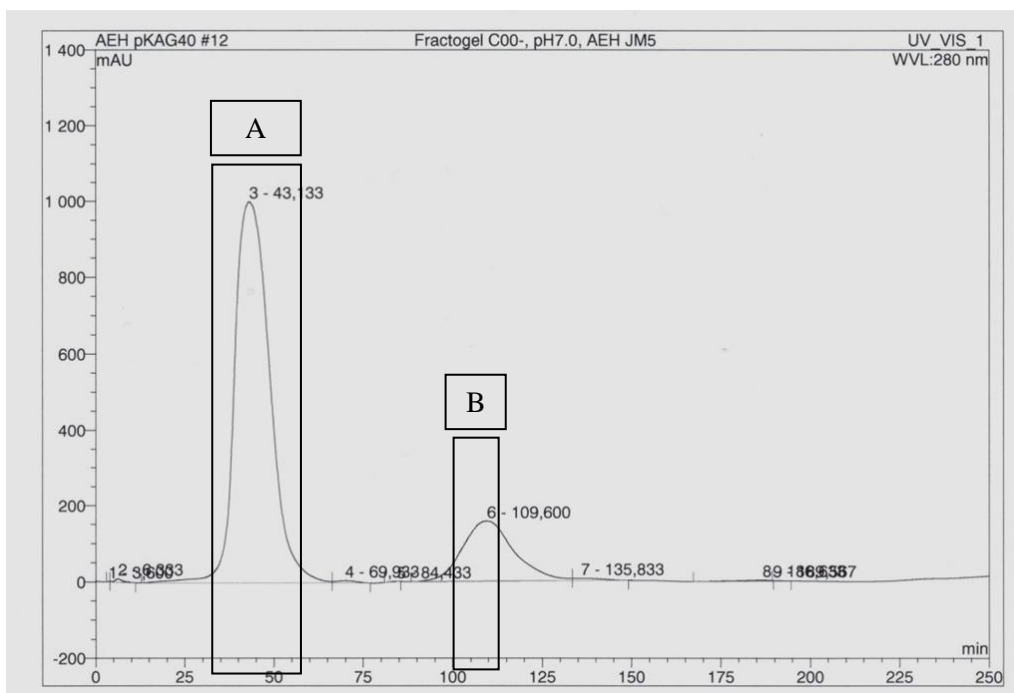


Obr. 15: Průběh kultivace *Escherichia coli* BL21(DE3)JM5 v míchaném bioreaktoru. Zkratky: CDW – hmotnost sušiny, SAH – specifická aktivita hydrolýzy ampicilinu, OD600 – optická densita měřená při 600 nm, VAH – volumetrická aktivita hydrolýzy ampicilinu. I1 a I2 – první a druhá indukce laktózou.

6.7 Izolace a purifikace AEH

Rekombinantní enzym AEH_{Asp} byl izolován z 44,05 g mokré hmotnosti zmražené biomasy (buněčné pasty) připravené v bioreaktoru, která byla rozpuštěna v 180 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0. Buňky byly rozbity pomocí sonikace a AEH byla izolována pomocí frakčního srážení síranem amonným.

Pro purifikaci enzymu byla použita pouze jedna třetina síranového precipitátu. Nejprve byl precipitát rozpuštěn ve 20 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,0. Následně byl roztok dialyzován v 5 litrech dialyzačního pufru přes noc. Po dialýze byl vzorek purifikován pomocí chromatografie na koloně naplněné Sephadexem. V průběhu vymývání enzymu z kolony procházela mobilní fáze detektorem HPLC a následně byla rozdělována do frakcí po 5 ml. V obrázku 16 jsou znázorněny naměřené hodnoty absorbance proteinu při 280 nm v mobilní fázi po průchodu kolonou. Jsou patrné 2 časové intervaly, kdy docházelo k eluci proteinů, které odpovídají „peakům“ A a B.



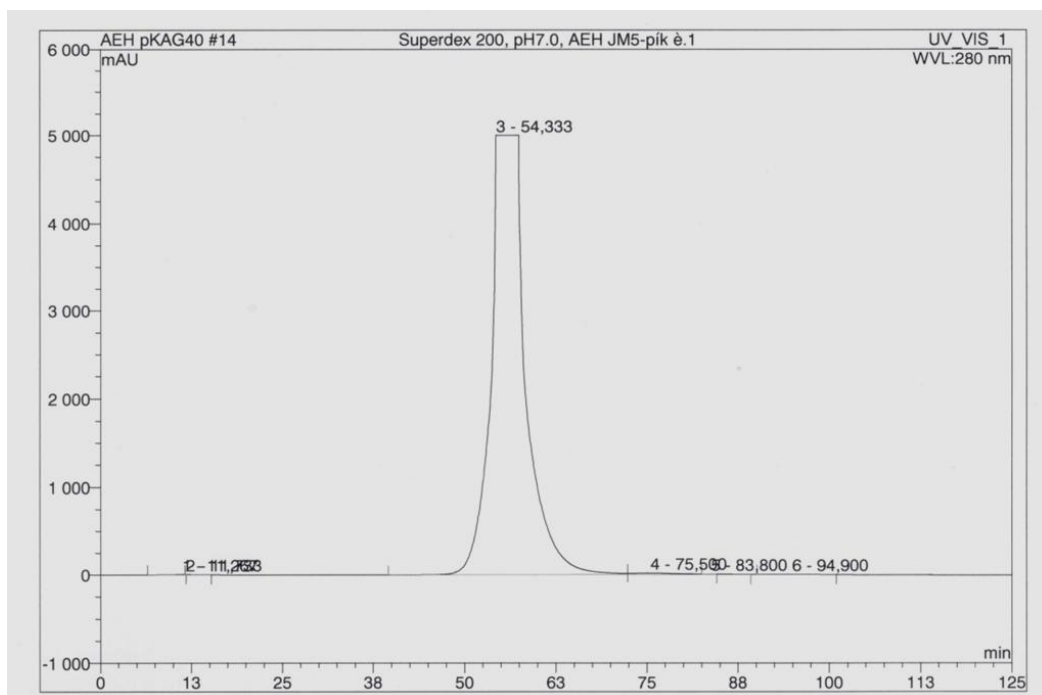
Obr. 16: Časový průběh hodnot A_{280} v eluátu po chromatografii. Vrcholy „peaků“ A a B označují 2 retenční časy uvolňování proteinů z kolony.

Ke každému „peaku“ byly přiřazeny příslušné frakce, které byly spojeny, a dále probíhala purifikace proteinu z každého „peaku“ odděleně. První „peak“ (A) byl tvořen frakcemi 15 – 23 (odpovídá eluci v čase: 37,5. minuta – 57,5. minuta), druhý (B) frakcemi 40 – 45 (eluce v čase: 100. – 112,5. minuta). Tímto byly získány dva vzorky s enzymem AEH.

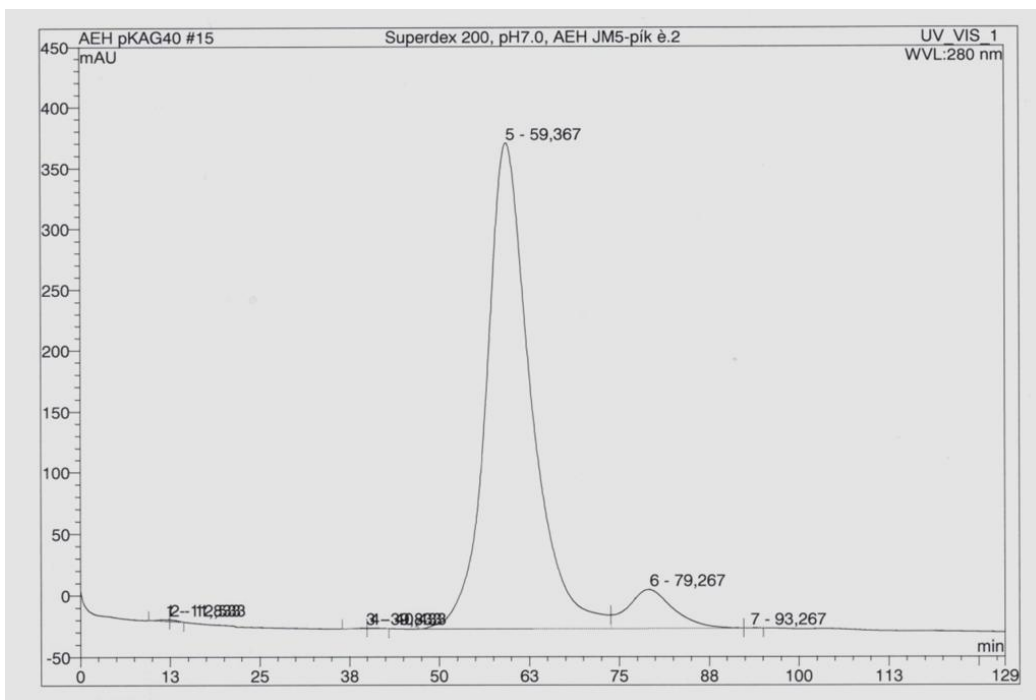
Dalším krokem purifikace byla gelová filtrace. Na kolony je možné nanášet maximálně 20 % celkového objemu pevné fáze. Proto musel být před nanášením na kolonu snížen objem každého vzorku pomocí ultrafiltrace.

Po nanesení vzorků na kolonu byl průtok kolonou byl nastaven na 1ml/min a jednotlivé frakce (2,5 ml) byly jímány po 2,5 min. V průběhu filtrace byla měřena absorbance jímaného roztoku a jeho retenční čas (Obr. 17).

A)



B)



Obr. 17: Závislosti absorbance proteinu A_{280} na retenčním času v průběhu gelové filtrace. A) frakce 15 – 23 chromatografie, B) frakce 40 – 45 chromatografie.

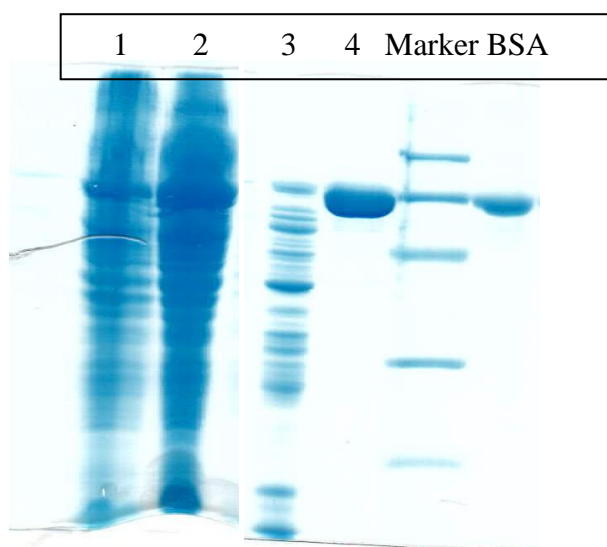
Z grafů uvedených na obrázku 17 jsou patrné časové intervaly, kdy se z kolony uvolňoval AEH_{Asp}. Frakce odpovídající jednotlivým intervalům byly spojeny tak, aby byl získán enzym

o co největší čistotě: z gelové filtrace prvního vzorku byly použity frakce 22 – 24 (55. – 60. min) a z gelové filtrace druhého vzorku byly použity frakce 23 – 26 (57,5. – 65. min).

U vzorků AEH z průběhu izolace a purifikace byla stanovena specifická a volumetrická hydrolytická aktivita (Tab. 7) a také byly použity do SDS-PAGE elektroforézy (Obr. 18).

Tab. 7: Shrnutí kroků izolace a purifikace AEH_{Asp}.

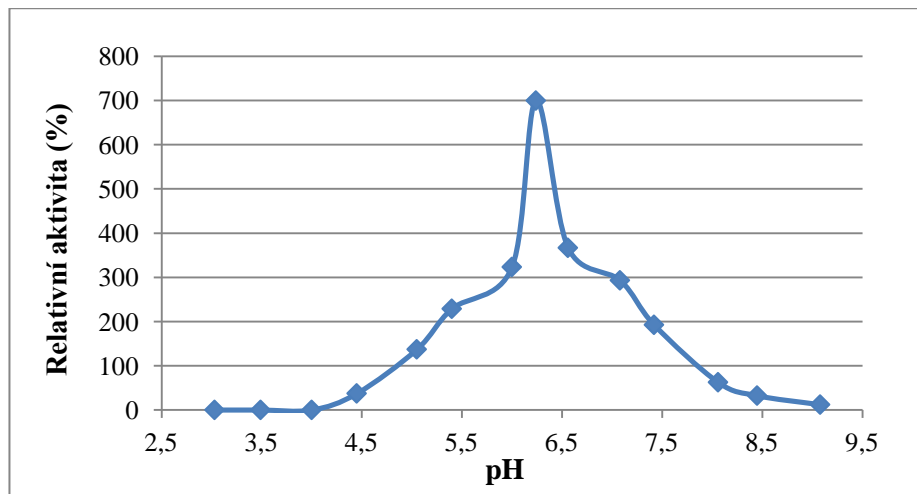
Purifikační krok	Volumetrická aktivita (U/ml)	Celkové množství proteinu (mg/ml)	Specifická aktivita (U/mg)	Výtěžek (%)	Purifikace (násobek)
Buněčná kultura	12,65	0,159	79,56	-	-
Cell-free extrakt	169	16,3	10,37	100	1
Rozpuštěný síranový precipitát	267	18,9	14,13	62	1,32
Po gelové filtraci A	567 ± 52,9	0,855	663,16 ± 30,5	36	63,96
Po gelové filtraci B	0	0,128	0	-	-



Obr. 18: Chromatogram z SDS – PAGE se vzorky z průběhu izolace a purifikace AEH_{Asp}. 1 - Rozpuštěný síranový precipitát, 2 – Roztok po dialýze, 3 – Zakoncentrovaný vzorek z peaku A po chromatografii na koloně naplněné fraktogelem COO⁻, 4 – Vzorek po gelové filtraci A, BSA – hovězí sérový albumin (slouží jako druhý marker). Marker SDS-PAGE Molecular Weight Standarts, Low Range.

6.8 Stanovení některých vlastností purifikovaného enzymu

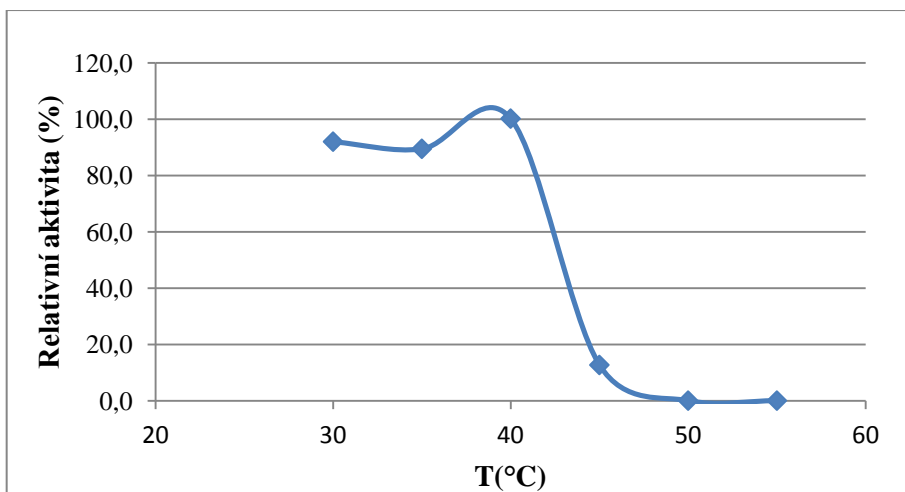
Pro stanovení pH optima hydrolytické aktivity AEH byl použit interval pH od 3 po 9 při reakční teplotě 30°C. Závislost hodnoty pH a aktivity enzymu jsou znázorněny v níže uvedeném grafu (Obr. 19). Vyplývá z něj, že purifikovaný enzym vykazuje nejvyšší aktivitu v mírně kyselém pH, a to kolem 6,4, a má poměrně úzké pH optimum.



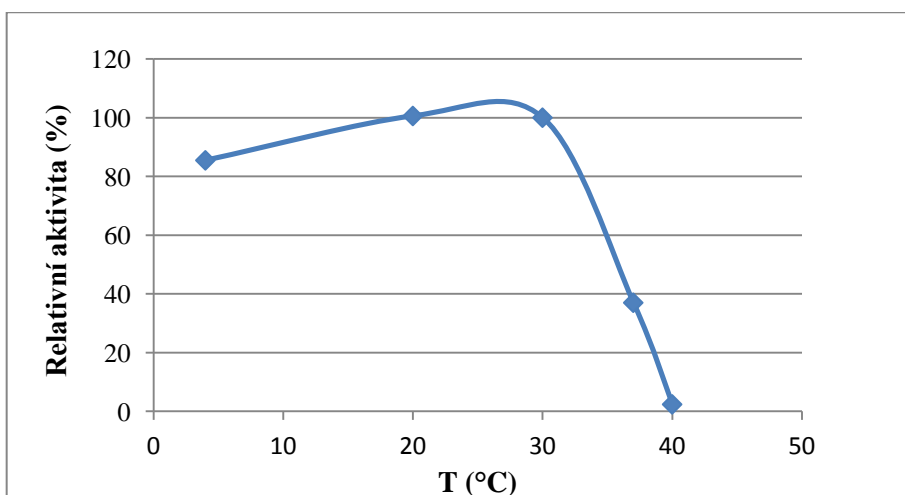
Obr. 19: pH optimum pro aktivitu purifikované AEH_{Asp}.

Teplotní optimum pro aktivitu purifikovaného enzymu bylo testováno v intervalu teplot 30 – 55°C při pH reakční směsi 7,0 (Obr. 20), přičemž nejvyšší hodnoty aktivity bylo dosaženo při teplotě 37°C.

Teplotní stabilita AEH_{Asp} byla stanovena za následujících podmínek: enzym byl vystaven zvolené teplotě (v intervalu 5 – 40°C) po dobu 30 minut v pufru o pH 7,0. Poté byla stanovena jeho zbytková aktivita při 30°C, pH 7,0 (Obr. 21).



Obr. 20: Teplotní optimum pro aktivitu purifikované AEH_{Asp}.



Obr. 21: Teplotní stabilita purifikovaného AEH_{Asp}.

Z výše uvedených grafů vyplývá, že teplotní optimum enzymu AEH_{Asp} je relativně široké, ale při teplotě nad 40°C jeho hydrolytická aktivita prudce klesá a od 55°C je v podstatě nulová. Zároveň je enzym je při nízkých teplotách po dobu 30 minut relativně stabilní, avšak v optimální teplotě pro svou aktivitu (38°C) má AEH_{Asp} již velmi nízkou stabilitu, takže po 30 minutách se jeho hydrolytická aktivita blíží nule.

Poslední charakteristikou testovanou u rekombinantního enzymu AEH_{Asp} bylo určení schopnosti enzymu hydrolyzovat různé typy substrátů (Tab. 8), přičemž substrátová specifita byla stanovována při teplotě 30°C a pH 7,0.

Tab. 8: Stanovení substrátové specifity purifikovaného AEH_{Asp}.

Substrát pro reakci	Relativní A^H (%)
Penicilin G	0
Ampicilin	100
Cefalexin	163

Z experimentálních výsledků je patrné, že purifikovaný enzym hydrolyzuje ampicilin a cefalexin, zatímco substrát s postranním řetězcem kyseliny fenyloctové, tj. penicilin G, hydrolyzován není.

7. Diskuze

Esterasy α -aminokyselin mají velký potenciál pro použití při výrobě β -laktamových antibiotik. V současné době se studiem tohoto enzymu izolovaného z různých mikroorganismů zabývá několik výzkumných skupin, kterým se podařilo poměrně dobře charakterizovat strukturu proteinu, přičemž doposud byly zkonstruovány indukibilní expresní systémy pro AEH z organismů *Acetobacter turbidans* (Polderman-Tijmes et al. 2002a), *Xanthomonas citri* (Barends et al. 2003), *Xanthomonas rubrilineans* (Wang et al. 2012; Sklyarenko et al. 2014) a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Blum a Bommarius 2010) vesměs založené na hostitelském kmenu *Escherichia coli*.

Cílem této práce bylo vytvořit expresní systém pro enzym esterasy α -aminokyselin, který pochází z nového organismu *Achromobacter* sp. CCM 4824 (Škrob et al. 2003). Diplomová práce navazuje na předchozí experimenty provedené v laboratoři, kdy v rámci vyhledávání nových penicilin-G-acylas z doposud nepopsaných zdrojů, byl vytvořen rekombinantní kmen *E. coli* DH5 α (pKAMP) obsahující plasmid s částí chromosomální DNA z mikroorganismu *Achromobacter* sp CCM 4824 a produkující enzym, který byl díky svým vlastnostem zařazen mezi esterasy α -aminokyselin a u něhož byla stanovena aminokyselinová sekvence několika fragmentů polypeptidu.

Pro získání genu *aeH*_{Asp} metodou PCR bylo navrženo 2 sady oligonukleotidů. První byla odvozena z již dříve osekvenovaných fragmentů AEH_{Asp}, přičemž všechny takto navržené degenerované primery odpovídaly nukleotidovým sekvencím jednotlivých peptidových fragmentů AEH a to s cílem získat delší *aeH*-specifický PCR produkt, než dosud amplifikovaný DNA fragment o přibližné velikosti 500 bp, jenž byl připraven pomocí standartní PCR na plasmidovém templátu pKAMP (nepublikované výsledky). Použití těchto primerů bohužel nevedlo k amplifikaci *aeH*-specifického PCR produktu, což mohlo být způsobeno zařazením vysoké míry degenerace do jednotlivých primerů. Jelikož však nukleotidová sekvence výše zmíněného původního interního 500 nt amplikonu vykazovala vysokou homologii s potenciálními *aeH* různých zástupců druhu *Stenotrophomonas*, které byly získány v rámci celogenomových sekvenačních projektů, pro další návrh další sady (v tomto případě již přímo 5' a 3'- koncových) primerů byla použita primární aminokyselinová sekvence hypotetického AEH proteinu zkonstruovaného *in silico* z jednotlivých AEH různých druhů *S. matophila*.

PCR amplifikace založené na kombinacích primerů nasedajících na koncové oblastní strukturního *aeH* genu a rekombinantním plasmidu pKAMP jako templátové DNA byly již úspěšnější, neboť se po PCR optimalizaci podařilo amplifikovat celý strukturní gen kódující AEH. Pro zvýšení výtěžku *aeH_{Asp}*-specifické amplifikace byla použita gradientová PCR s rozmezím teplot 46 – 66°C, které bylo nastaveno tak, aby pokrylo co možná nejširší teplotní škálu, přičemž velikostně odpovídající produkt vznikal téměř výhradně při teplotě 51°C. Tato relativně nízká hodnota optimální reasociace primeru s plasmidovým templátem během vlastní PCR reakce je s ohledem na to, že šlo o delší oligonukleotidy docela překvapivá, avšak jedním z možných vysvětlení by mohlo být například to, že sekvence použitých primerů odvozených od *aeH* rodu *Stenotrophomonas* se přece jen výrazněji liší od koncových oblastí klonovaného strukturního genu *aeH_{Asp}* k nimž měly nasedat.

Ze sekvenační analýzy subklonovaného kompletního strukturního genu *aeH_{Asp}* pocházejícího z organismu *Achromobacter* sp CCM 4824 vyplynulo, že je dlouhý 1 914 nukleotidů, což je v souladu se zjištěnými velikostmi AEH genů z jiných organismů, u nichž je uváděna obdobná, či zcela totožná (*aeH_{Xc}* - Barends et al. 2003) velikost. Ze získané nukleotidové sekvence byla odvozena sekvence aminokyselin v proteinu a obě sekvence byly porovnány s dostupnými sekvencemi jiných esterů α -aminokyselin. Z přiřazení je patrná vysoká míra homologie získaných sekvencí AEH_{Asp} s jinými AEH, přičemž fylogeneticky je náš enzym mnohem bližší enzymům izolovaným z rodu *Xanthomonas*, než AEH z *Acetobacter turbidans*. Na základě *in silico* analýzy aminokyselinové sekvence AEH_{Asp} odvozené od strukturního genu byla identifikována signální sekvence a kalkulována velikost nativní formy monomeru enzymu na 69 kDa. Predikovaná signální sekvence obsahuje 22 aminokyselin, což o jeden aminokyselinový zbytek nesouhlasí se zjištěním platným pro AEH z *Xanthomonas citri*, u které začíná strukturní podjednotka 24. aminokyselinou (Barends et al. 2003).

Molekulární velikost AEH_{Asp}, která byla navržena na základě aminokyselinové sekvence je nižší, než experimentálně stanovená molekulární hmotnost AEH_{Xc}. Tento rozdíl by mohl být způsobený rozdílem ve štěpném místě signální sekvence, v rámci dalších experimentů s AEH_{Asp} by bylo vhodné ověřit místo odštěpení signální sekvence i výslednou molekulovou hmotnost nativní podjednotky experimentálně.

K přípravě vysoce produkčního bakteriálního expresního systému bylo přistoupeno proto, že bylo třeba získat velké množství biomasy nadprodukující AEH_{Asp} nejen pro další charakterizaci enzymového produktu jako takového, ale i jako zdroj AEH pro přípravu enzymového biokatalyzátoru pro biotransformace β -laktamových antibiotik v navazujících projektech. V navazujících projektech bude expresní systém využit pro přípravu enzymového biokatalyzátoru a jeho testy pro biotransformace β -laktamových antibiotik. Bakteriální expresní systém pro produkci AEH byl vytvořen s použitím kmene *E. coli* BL21(DE3) a vektoru pET-26b (+). Takový inducibilní expresní systém umožňuje oddělit růstovou fázi kultury od fáze produkce enzymu. Jelikož pro obdobně konstruované pET-expresní systémy bylo již dříve v laboratoři vyvinuto základní kultivační schéma založené na přítokované kultivaci v bioreaktoru, byla touto cestou zároveň ověřena i jeho aplikovatelnost na další exprimovaný cizorodý bakteriální strukturní gen, v tomto případě *aeh_{Asp}*.

Kultivace kmene *E. coli* BL21(DE3)JM5 byla provedena v míchaném bioreaktoru (funkční objem 6 litrů). Konečné parametry kultivace (6 084 U/g_{cdw}) dokládají vysokou produkci maturovaného a funkčního enzymu, který představuje asi 19 % z celkového množství rozpustných proteinů. Jelikož však velkoobjemové kultivace expresních systémů, které se zabývají rekombinantními AEH, nejsou v jednotlivých pracích popsány v jiných než bankových experimentech, není s čím výše uvedené produkční výtěžky kultivace v laboratorním bioreaktoru srovnat (Kato et al. 1980a; Barends et al. 2003).

V další části mé práce byl rekombinantní enzym purifikovaný dle postupu purifikace AEH_{Xc} (Kato et al. 1980a) charakterizován ohledně specifické aktivity, substrátové specifity, pH optima a teplotního optima pro aktivitu a teplotní stability. Mírně kyselé pH optimum (6,4) odpovídá poznatkům o AEH z jiných organismů (Cole 1969a; Kato et al. 1980b; Polderman-Tijmes et al. 2002a; Barends et al. 2003). Nízká stabilita při 40°C a téměř nulová naměřená hydrolytická aktivita v 50°C se rovněž shoduje s publikovanými daty o teplotní stabilitě AEH, přestože stabilita AEH_{Xc} byla měřena při inkubaci purifikovaného enzymu po dobu 15 minut v dané teplotě (Kato et al. 1980b; Blum a Bommarius 2010), zatímco AEH_{Asp} byl preinkubován v různých teplotách po dobu 30 minut. Zjištěná nízká stabilita enzymu by mohla souviset s multimerní kvartérní strukturou AEH, neboť tyto enzymy jsou známy jako dimery či tetramery stejných subjednotek (Kato et al. 1980a; Barends et al. 2003; Polderman-Tijmes et al. 2002a), u

nichž v podmínkách jiných, než jsou fyziologické, dochází ve zvýšené míře k disociaci podjednotek a enzym přestává být aktivní (Torchilin et al. 1983).

Závěrečné testování substrátové specifity opětovně potvrdilo, že purifikovaný enzym je esterasa α -aminokyselin, protože nehydrolyzuje penicilin G, který nenese aminoskupinu na α -C. Předpokládaná schopnost rychleji hydrolyzovat cefalosporin byla též potvrzena.

8. Souhrn

Všechny stanovené cíle, tj. získat strukturní gen pro enzym *aeH_{Asp}*, charakterizovat jej a vytvořit expresní systém pro vysokou produkci příslušného enzymu, se podařilo splnit:

- Pomocí PCR byl naklonován kompletní strukturní gen *aeH_{Asp}* pocházející z mikroorganismu *Achromobacter* sp. CM 4824 a kódující esterasu α -aminokyselin.
- Byla anotována nukleotidová sekvence *aeH_{Asp}* a podle ní předpovězena struktura proteinové podjednotky; strukturní gen je tvořen 1 914 nukleotidy, včetně terminačního stop kodonu a prvních 66 nukleotidů kóduje signální sekvenci.
- Byl vytvořen inducibilní pET-expresní systém *Escherichia coli* BL21(DE3)JM5 produkující funkční rekombinantní AEH_{Asp}.
- Vysoká produkce rekombinantní AEH_{Asp} expresním systémem *E. coli* BL21(DE3)JM5 byla ověřena v režimu přítokované kultivace v míchaném bioreaktoru Biostat MD po indukci laktózou; rekombinantní protein AEH_{Asp} tvořil při ukončení kultivace až 19 % z celkových rozpustných proteinů.

Purifikovaný rekombinantní enzym AEH_{Asp} byl charakterizován s ohledem na teplotní a pH optima i stability, přičemž tyto jeho vlastnosti jsou v souladu s publikovanými daty získanými pro jiné AEH.

Seznam citací:

- Acharya, A., X. J. Xu, R. D. Husain-Ponnampalam, S. Hoffmann-Benning, a M. H. Kuo. 2005. „Production of constitutively acetylated recombinant p53 from yeast and *Escherichia coli* by tethered catalysis.” *Protein Expression and Purification* 41 (2): 417–25.
- Alkema, W. B. L., C. M. H. Hensgens, E. H. Kroezinga, E. de Vries, R. Floris, J. M. van der Laan, B. W. Dijkstra, a D. B. Janssen. 2000. „Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies.” *Protein Engineering* 13 (12): 857–63.
- Andersson, I., A. C. T. van Scheltinga, a K. Valegard. 2001. „Towards new beta-lactam antibiotics.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (12-13): 1897–1906.
- Arshad, R., S. Farooq, a S. S. Ali. 2010a. „Effect of mutations induced by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine on expression of penicillin G acylase and beta-lactamase in wild type *Escherichia coli* strains.” *Annals of Microbiology* 60 (4): 645–52.
- Arshad, R., S. Farooq, a S. S. Ali. 2010b. „Improvement of penicillin G acylase expression in *Escherichia coli* through UV induced mutations.” *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (4): 1133–41.
- Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, a M. D. Lilly. 1972. „Isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 276 (1): 250 – &.
- Baneyx, F. 1999. „Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.” *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5): 411–21.
- Barends, T. R. M., J. J. Polderman-Tijmes, P. A. Jekel, C. M. H. Hensgens, E. J. de Vries, D. B. Janssen, a B. W. Dijkstra. 2003. „The sequence and crystal structure of the alpha-amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of beta-lactam antibiotic acylases.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 23076–84.
- Barends, T. R. M., J. J. Polderman-Tijmes, P. A. Jekel, C. Williams, G. Wybenga, D. B. Janssen, a B. W. Dijkstra. 2006. „*Acetobacter turbidans* alpha-amino acid ester hydrolase - How a single mutation improves an antibiotic producing enzyme.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (9): 5804–10.
- Bhattacharya, S., V. S. Gupta, A. A. Prabhune, H. Sivaraman, M. Debnath, a P. K. Ranjekar. 1993. „Studies of operational variables in batch mode for genetically engineered *Escherichia coli* cells containing penicillin acylase”. *Enzyme and Microbial Technology* 15 (12): 1070–73.
- Bingle, W. H., J. F. Nomellini, a J. Smit. 2000. „Secretion of the *Caulobacter Crescentus* S-Layer Protein: Further localization of the C-terminal secretion signal and its use for secretion of recombinant proteins.” *Journal of Bacteriology* 182 (11): 3298–3301.
- Birnboim, H. C., a J. Doly. 1979. „Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” *Nucleic Acids Research* 7 (6): 1513–23.
- Blinkovsky, A. M., a A. N. Markaryan. 1993. „Synthesis of beta-lactam antibiotics containing alpha-aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl-beta-lactamide amidohydrolase.” *Enzyme and Microbial Technology* 15 (11): 965–73.
- Blum, J. K., a A. S. Bommarius. 2010. „Amino ester hydrolase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ATCC 33913 for enzymatic synthesis of ampicillin.” *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 67 (1-2): 21–28.

- Bruggink, A., E. C. Roos, a E. de Vroom. 1998. „Penicillin acylase in the industrial production of beta-lactam antibiotics.” *Organic Process Research & Development* 2 (2): 128–33.
- Burnette, T. C., J. A. Harrington, J. E. Reardon, B. M. Merrill, a P. Demiranda. 1995. „Purification and characterization of a rat liver enzyme that hydrolyzes valaciclovir, the L-valyl ester prodrug of acyclovir.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (26): 15827–31.
- Carrio, M. M., R. Cubarsi, a A. Villaverde. 2000. „Fine architecture of bacterial inclusion bodies.” *Febs Letters* 471 (1): 7–11.
- Cole, M. 1969b. „Factors affecting synthesis of ampicillin and hydroxypenicillins by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia Coli*”. *Biochemical Journal* 115 (4): 757 – &.
- Cole, M. 1969a. „Hydrolysis of penicillins and related compounds by cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*”. *Biochemical Journal* 115 (4): 733 – &.
- Dammeyer, T., M. Steinwand, S. C. Krueger, S. Duebel, M. Hust, a K. N. Timmis. 2011. „Efficient production of soluble recombinant single chain fv Fragments by a *Pseudomonas putida* strain KT2440 cell factory.” *Microbial Cell Factories* 10 (únor): 11.
- Deaguero, A. L., J. K. Blum, a A. S. Bommarius. 2012. „Improving the diastereoselectivity of penicillin G acylase for ampicillin synthesis from racemic substrates.” *Protein Engineering Design & Selection* 25 (3): 135–44.
- Derouazi, M., B. Toussaint, L. Quenee, O. Epaulard, M. Guillaume, R. Marlu, a B. Polack. 2008. „High-yield production of secreted active proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (11): 3601–4.
- Elander, R. P. 2003. „Industrial production of beta-lactam antibiotics.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (5-6): 385–92.
- Fang, H., X. Zhang, L. Shen, X. Si, Y. Ren, H. Dai, S. Li, Ch. Zhou, a H. Chen. 2009. „RimJ is responsible for N (alpha)-acetylation of thymosin alpha 1 in *Escherichia coli*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (1): 99–104.
- Feldman, M. F., M. Wacker, M. Hernandez, P. G. Hitchen, C. L. Marolda, M. Kowarik, H. R. Morris, A. Dell, M. A. Valvano, a M. Aebi. 2005. „Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 3016–21.
- Fernandez-Lafuente, R., O. Hernandez-Justiz, C. Mateo, M. Terreni, J. Alonso, J. L. Garcia-Lopez, M. A. Moreno, a J. M. Guisan. 2001. „Stabilization of a tetrameric enzyme (alpha-amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*) enables a very improved performance of ampicillin synthesis.” *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 11 (4-6): 633–38.
- Giordano, R. C., M. P. A. Ribeiro, a R. L. C. Giordano. 2006. „Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization.” *Biotechnology Advances* 24 (1): 27–41.
- Hagg, P., J. W. de Pohl, F. Abdulkarim, a L. A. Isaksson. 2004. „A Host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*.” *Journal of Biotechnology* 111 (1): 17–30.
- Huang, K., M. Badger, K. Haney, a S. L. Evans. 2007. „Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*.” *Protein Expression and Purification* 53 (2): 325–30.
- Chandel, A. K., L. V. Rao, M. L. Narasu, a O. V. Singh. 2008. „The realm of penicillin G acylase in beta-lactam antibiotics.” *Enzyme and Microbial Technology* 42 (3): 199–207.

- Chart, H., H. R. Smith, R. M. la Ragione, a M. J. Woodward. 2000. „An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 alpha and EQ1.” *Journal of Applied Microbiology* 89 (6): 1048–58.
- Chen, R. 2012. „Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond.” *Biotechnology Advances* 30 (5): 1102–7.
- Chiang, C., a R. Bennett. 1967. „Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*”. *Journal of Bacteriology* 93 (1): 302 – &.
- Itaya, H., a Y. Kikuchi. 2008. „Secretion of *Streptomyces nobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (4): 621–25.
- Jager, S. A. W., P. A. Jekel, a D. B. Janssen. 2007. „Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of beta-lactam antibiotics.” *Enzyme and Microbial Technology* 40 (5): 1335–44.
- Jager, S. A. W., I. V. Shapovalova, P. A. Jekel, W. B. L. Alkema, V. K. Svedas, a D. B. Janssen. 2008. „Saturation mutagenesis reveals the importance of residues alpha R145 and alpha F146 of penicillin acylase in the synthesis of beta-lactam antibiotics.” *Journal of Biotechnology* 133 (1): 18–26.
- Jonasson, P., S. Liljeqvist, P. A. Nygren, a S. Stahl. 2002. „Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*.” *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35 (duben): 91–105.
- Kato, K., K. Kawahara, T. Takahashi, a A. Kakinuma. 1980a. „Studies on alpha-amino-Acid ester hydrolase of *Xanthomonas citri* .1. purification of alpha-amino-acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*.” *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (5): 1069–74.
- Kato, K., K. Kawahara, T. Takahashi, a A. Kakinuma. 1980b. „Studies on alpha-amino-acid ester hydrolase of *Xanthomonas citri* .2. Substrate-specificity of alpha-amino-acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri*.” *Agricultural and Biological Chemistry* 44 (5): 1075–81.
- Kim, D. J., a S. M. Byun. 1990. „Purification and properties of ampicillin acylase from *Pseudomonas melanogenum*.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1040 (1): 12–18.
- Kim, I., X. Y. Chu, S. Kim, C. J. Provoda, K. D. Lee, a G. L. Amidon. 2003. „Identification of a human valacyclovirase - biphenyl hydrolase-like protein as valacyclovir hydrolase.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25348–56.
- Kim, I., X. Song, B. S. Vig, S. Mittal, H. Shin, P. J. Lorenzi, a G. L. Amidon. 2004. „A novel nucleoside prodrug-activating enzyme: Substrate specificity of biphenyl hydrolase-like protein.” *Molecular Pharmaceutics* 1 (2): 117–27.
- Klei, H., G. Daumy, a J. Kelly. 1995. „Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*”. *Protein Science* 4 (3): 433–41.
- Konno, R., a Y. Yasumura. 1992. „D-amino-acid oxidase and its physiological-function.” *International Journal of Biochemistry* 24 (4): 519–24.
- Krestyanova, I. N., N. M. Uvarov, G. N. Rudenskaya, V. V. Tsibanov, L. I. Vasileva, a V. M. Stepanov. 1990. „An intracellular aminopeptidase from *Xanthomonas rubrilineans*, which hydrolyzes alpha-amino-acid esters and cephalixin.” *Biochemistry-Moscow* 55 (12): 1658–68.
- Kroll, J., S. Klintner, C. Schneider, I. Voss, a A. Steinbuechel. 2010. „Plasmid addiction systems: Perspectives and applications in biotechnology.” *Microbial Biotechnology* 3 (6): 634–57.
- Kroll, J., S. Klintner, a A. Steinbuechel. 2011. „A novel plasmid addiction system for large-scale production of cyanophycin in *Escherichia coli* using mineral salts medium.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (3): 593–604.

- Kroll, J., A. Steinle, R. Reichelt, Ch. Ewering, a A. Steinbuechel. 2009. „Establishment of a novel anabolism-based addiction system with an artificially introduced mevalonate pathway: Complete stabilization of plasmids as universal application in white biotechnology.” *Metabolic Engineering* 11 (3): 168–77.
- Krzeslak, J., P. Braun, R. Voulhoux, R. H. Cool, a W. J. Quax. 2009. „Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Journal of Biotechnology* 142 (3-4): 250–58.
- Laemmli, U. K. 1970. „Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4.” *Nature* 227 (5259): 680 – &.
- Larsen, N. A., J. M. Turner, J. Stevens, S. J. Rosser, A. Basran, R. A. Lerner, N. C. Bruce, a I. A. Wilson. 2002. „Crystal structure of a bacterial cocaine esterase.” *Nature Structural Biology* 9 (1): 17–21.
- Lincová, D., H. Farghali et al. 2007. „Základní a aplikovaná farmakologie“, druhé vydání. Nakl. Galen
- Makrides, S. C. 1996. „Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*.” *Microbiological Reviews* 60 (3): 512 – &.
- Morello, E., L. G. Bermudez-Humaran, D. Llull, V. Sole, N. Miraglio, P. Langella, a I. Poquet. 2008. „*Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion.” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14 (1-3): 48–58.
- Murata, T., Y. Shinozuka, Y. Obata, a K. K. Yokoyama. 2008. „Phosphorylation of two eukaryotic transcription factors, Jun dimerization protein 2 and activation transcription factor 2, in *Escherichia coli* by Jun N-terminal kinase 1.” *Analytical Biochemistry* 376 (1): 115–21.
- Neumann, H., S. Y. Peak-Chew, a J. W. Chin. 2008. „Genetically encoding N-epsilon-acetyllysine in recombinant proteins.” *Nature Chemical Biology* 4 (4): 232–34.
- Ohashi, H., Y. Katsuta, T. Hashizume, S. N. Abe, H. Kajiura, H. Hattori, T. Kamei, a M. Yano. 1988. „Molecular-cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*”. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11): 2603–7.
- Ollis, D. L, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, et al. 1992. „The alpha/beta-hydrolase fold.” *Protein Engineering* 5 (3): 197–211.
- Ospina, S., E. Barzana, O. T. Ramirez, a A. LopezMunguia. 1996. „Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase.” *Enzyme and Microbial Technology* 19 (6): 462–69.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne, a H. Nielsen. 2011. „SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.” *Nature Methods* 8 (10): 785–86.
- Peubez, I., N. Chaudet, Ch. Mignon, G. Hild, S. Husson, V. Courtois, K. De Luca, D. Speck, a R. Sodayer. 2010. „Antibiotic-free selection in *E. coli*: New considerations for optimal design and improved production.” *Microbial Cell Factories* 9 (září): 65.
- Phillips, T. A., R. A. Vanbogelen, a F. C. Neidhardt. 1984. „lon gene-product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein.” *Journal of Bacteriology* 159 (1): 283–87.
- Plháčková, K., S. Bečka, F. Škrob, a P. Kyslík. 2003. „Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp. with beta-lactam antibiotic acylase activity”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (5-6): 507–16.
- Polderman-Tijmes, J. J., P. A. Jekel, E. J. de Vries, A. E. J. van Merode, R. Floris, J. M. van der Laan, T. Sonke, a D. B. Janssen. 2002a. „Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an alpha-amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (1): 211–18.

- Polderman-Tijmes, J. J., P. A. Jekel, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins, J. M. van der Laan, T. Sonke, a D. B. Janssen. 2002b. „Identification of the catalytic residues of alpha-amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans* by Labeling and Site-Directed Mutagenesis.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 28474–82.
- Rajendhran, J., a P. Gunasekaran. 2007. „Application of cross-linked enzyme aggregates of *Bacillus badius* penicillin G acylase for the production of 6-aminopenicillanic acid”. *Letters in Applied Microbiology* 44 (1): 43–49.
- Ren, Y., X. Yao, H. Dai, S. Li, H. Fang, H. Chen, a Ch. Zhou. 2011. „Production of N-alpha-acetylated thymosin alpha 1 in *Escherichia coli*.” *Microbial Cell Factories* 10 (duben): 26.
- Robas, N., a C. Branlant. 1994. „The expression of the penicillin G amidase gene of *Escherichia coli* by primer extension analysis”. *Current Microbiology* 29 (5): 263–68.
- Rolinson, G. N., F. R. Batchelor, D. Butterworth, J. Cameronwood, M. Cole, G. C. Eustace, M. V. Hart, M. Richards, a E. V. Chain. 1960. „Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis.” *Nature* 187 (4733): 236–37.
- Shewale, J. G., a H. Sivaraman. 1989. „Penicillin acylase enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA.” *Process Biochemistry* 24 (4): 146–54.
- Shewale, J. G., a V. K. Sudhakaran. 1997. „Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid.” *Enzyme and Microbial Technology* 20 (6): 402–10.
- Schaegger, H. 2006. „Tricine-SDS-PAGE.” *Nature Protocols* 1 (1): 16–22.
- Sklyarenko, A. V., O. V. Berezina, D. E. Satarova, V. V. Fedorchuk, E. A. Fedorchuk, S. S. Savin, S. V. Yarotsky, a V. I. Tishkov. 2014. „Recombinant alpha-amino ester acid hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans* VKPM B-9915 is a highly efficient biocatalyst of cephalixin synthesis.” *Moscow University Chemistry Bulletin* 69 (2): 62–67.
- Sorensen, H. P., a K. K. Mortensen. 2005. „Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*.” *Journal of Biotechnology* 115 (2): 113–28.
- Studier, F. W. 1991. „Use of bacteriophage-T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system.” *Journal of Molecular Biology* 219 (1): 37–44.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, a J. W. Dubendorff. 1990. „Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.” *Methods in Enzymology* 185: 60–89.
- Sudhakaran, V. K., B. S. Deshpande, S. S. Ambedkar, a J. G. Shewale. 1992. „Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases.” *Process Biochemistry* 27 (3): 131–43.
- Suresh, C. G., A. V. Pundle, H. SivaRaman, K. N. Rao, J. A. Brannigan, C. E. McVey, C. S. Verma, Z. Dauter, E. J. Dodson, a G. G. Dodson. 1999. „Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members.” *Nature Structural Biology* 6 (5): 414–16.
- Škrob, F., S. Bečka, K. Plhačková, V. Fotopulosova, a P. Kyslík. 2003. „Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp CCM 4824.” *Enzyme and Microbial Technology* 32 (6): 738–44.
- Takahashi, T., Y. Yamazaki, a K. Kato. 1974. „Substrate specificity of an alpha-amino-acid ester hydrolase produced by *Acetobacter turbidans* ATCC 9325.” *Biochemical Journal* 137 (3): 497–503.
- Takahashi, Y., Y. Yamazaki, K. Kato, a M. Isono. 1972. „Enzymatic synthesis of cephalosporins”. *Journal of the American Chemical Society* 94 (11): 4035 – &.
- Terpe, K. 2006. „Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2): 211–22.

- Torchilin, V. P., V. S. Trubetskoy, V. G. Omelyanenko, a K. Martinek. 1983. „Stabilization of subunit enzyme by intersubunit crosslinking with bifunctional reagents - Studies with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.” *Journal of Molecular Catalysis* 19 (3): 291–301.
- Udaka, S., a H. Yamagata. 1993. „High-level secretion of heterologous proteins by *Bacillus brevis*.” *Methods in Enzymology* 217: 23–33.
- Ulmanen, I., K. Lundstrom, P. Lehtovaara, M. Sarvas, M. Ruohonen, a I. Palva. 1985. „Transcription and translation of foreign genes in *Bacillus subtilis* by the aid of a secretion vector.” *Journal of Bacteriology* 162 (1): 176–82.
- Van Boeckel, T. P., S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B. T. Grenfell, S. A. Levin a R. Laxminarayan. 2014. „Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data”. *The Lancet Infectious Diseases* 14 (8): 742–50.
- Hodge, R. A., a H. J. Field. 2013. „Antiviral agents for herpes simplex virus.” *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.) 67: 1–38.
- Vrancken, K., a J. Anne. 2009. „Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*.” *Future Microbiology* 4 (2): 181–88.
- Wacker, M., M. F. Feldman, N. Callewaert, M. Kowarik, B. R. Clarke, N. L. Pohl, M. Hernandez, et al. 2006. „Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (18): 7088–93.
- Wacker, M., D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, et al. 2002. „N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*.” *Science* 298 (5599): 1790–93.
- Wang, L., L. Ye, Y. Pan, a Y. Cao. 2012. „Two plate-based colorimetric assays for screening alpha-amino acid ester hydrolase with high synthesis/hydrolysis ratio.” *Enzyme and Microbial Technology* 51 (2): 107–12.
- Zarubina, S. A., I. V. Uporov, E. A. Fedorchuk, V. V. Fedorchuk, A. V. Sklyarenko, S. V. Yarotsky, a V. I. Tishkov. 2013. „3D structure modeling of alpha-amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans*.” *Acta Naturae* 5 (4): 62–70.